

# **Effekter på insulinsekresjon og endotelfunksjon av DPP-IV-hemmeren sitagliptin (Januvia<sup>®</sup>) hos pasienter som har utviklet diabetes etter nyretransplantasjon.**

Thea Anine Strøm Halden



Masteroppgave ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk- naturvitenskaplige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Mai 2012



# **Effekter på insulinsekresjon og endotelfunksjon av DPP-IV-hemmeren sitagliptin (Januvia<sup>®</sup>) hos pasienter som har utviklet diabetes etter nyretransplantasjon.**

Thea Anine Strøm Halden

Masteroppgave ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap  
Farmasøytisk institutt  
Det matematisk- naturvitenskaplige fakultet

Veiledere:

Anders Åsberg, professor dr. cand. scient  
Trond Jenssen, overlege professor dr. med  
Anders Hartmann, overlege professor dr. med

Utført ved  
Nyrefysiologisk Laboratorium  
Medisinsk Avdeling  
Rikshospitalet  
Oslo

© Forfatter

2012

Effekter på insulinsekresjon og endotelfunksjon av DPP-IV-hemmeren sitagliptin (Januvia<sup>®</sup>) hos pasienter som har utviklet diabetes etter nyretransplantasjon.

Forfatter: Thea Anine Strøm Halden

<http://www.duo.uio.no/>

Trykk: Reprosentralen, Universitetet i Oslo

# Forord

Det har vært et fantastisk lærerikt og spennende år, og det har vært trivelig å utføre masteroppgaven ved Nyrefysiologisk laboratorium, OUS Rikshospitalet. Jeg vil takke alle som har bidratt og hjulpet meg med masteroppgaven, og en ekstra stor takk til:

Professor dr. cand. scient Anders Åsberg som alltid har vært tilgjengelig for å svare på store og små spørsmål. Takk for god veiledning med Laser-Doppler, ustoppelig optimisme og hjelp under skriveprosessen.

Overlege professor dr. med Trond Jenssen for faglig veiledning under hele studien og under skriveprosessen, alltid godt humør og for å ha utfordret meg til å delta på stipendiatkonferansen i diabetesforbundet.

Seksjonsoverlege professor dr. med Anders Hartmann for god oppfølging, faglige innspill og motivasjon under hele studien.

Bioingeniør Kirsten Lund for uvurderlig hjelp og veiledning på undersøkelsesdagene samt lange og koselige samtaler både under og utenom lunsjpausene.

Bioingeniørene Jean Stenstrøm, Els Breistein og May Ellen Lauritsen som tok meg godt imot på laben og for tålmodig hjelp samt hyggelige samtaler.

Studiesykepleierene Hilde Hestvaag og Line Bråten for praktisk hjelp og mye latter.

Lege Jørn Petter Lindahl som stilte opp for å ta legekonsultasjonen på undersøkelsesdagene ved ”hektiske tider”.

Ingeniørene Hilde Nilsen og Siri Johannesen ved Avdeling for farmasøytisk biovitenskap Farmasøytisk Institutt for hjelp på laben i 4. etasje ved oppstart av ELISA-analysene.

Alle pasientene som velvillig stilte opp og gjorde studien mulig å gjennomføre.

Til slutt vil jeg takke familie, venner og ”farmasijentene” mine som har fulgt meg og støttet meg gjennom hele studiet. En spesiell takk til mamma som motiverte meg til å studere farmasi. Takk til min kjære Morten for all tålmodighet og som alltid har vært der for meg og støttet meg.

Oslo, mai 2012.

Thea Anine Strøm Halden

---

# Innholdsfortegnelse

Summary in English .....	X
Sammendrag .....	XII
Forkortelser .....	XIV
<b>1 Introduksjon .....</b>	<b>1</b>
1.1 Aktiv nyresviktbehandling .....	1
1.1.1 Nyretransplantasjon.....	1
1.1.2 Immunsuppressiv behandling.....	3
1.2 Nyoppstått diabetes mellitus etter transplantasjon .....	4
1.2.1 Definisjon og diagnose .....	4
1.2.2 Insidens.....	5
1.2.3 Patogenese .....	6
1.2.4 Risikofaktorer for NODAT .....	6
1.2.5 Diabetogene effekter av immunsuppressiva .....	9
1.2.6 Behandling av NODAT.....	11
1.3 Kardiovaskulær risikoprofil hos nyretransplanterte pasienter med NODAT.....	13
1.3.1 Endotelet og endoteldysfunksjon .....	13
1.3.2 Aterosklerose.....	14
1.3.3 Markører av interesse i denne oppgaven.....	15
1.4 Sitagliptin (Januvia®).....	17
1.4.1 Virkningsmekanisme.....	17
1.4.2 Farmakokinetiske egenskaper .....	19
1.4.3 Sikkerhetsprofil .....	20
1.4.4 Pleiotrope effekter av sitagliptin .....	21
1.5 Studiens hensikt.....	22
<b>2 Materialer og metoder .....</b>	<b>23</b>
2.1 Studiedesign.....	23
2.2 Pasienter.....	25
2.3 Oral glukosetoleransetest.....	26
2.3.1 Metode.....	26
2.3.2 Praktisk prosedyre .....	26
2.4 Hjemmemåling av blodsukker.....	27

2.5	Mikrovaskulær endotelfunksjon .....	27
2.5.1	Laser-Doppler flowmetri .....	27
2.5.2	Iontoforese .....	28
2.5.3	Endotelavhengig vasodilatasjon .....	28
2.5.4	Postokklusiv reaktiv hyperemi (PORH) .....	29
2.5.5	Praktisk prosedyre .....	29
2.6	Prøvetaking .....	30
2.6.1	Blod .....	30
2.6.2	Urin .....	30
2.6.3	Blodtrykk .....	30
2.7	Analyser av biokjemiske markører .....	31
2.7.1	ELISA-kit .....	31
2.7.2	Analyse av C-peptid .....	33
2.7.3	Analyse av insulin .....	34
2.7.4	Analyse av mikro-CRP .....	35
2.7.5	Analyse av VCAM-1 ("vascular cell adhesion molecule-1") .....	37
2.7.6	Analyse av sTNFR-1 ("soluble tumor necrosis factor receptor-1") .....	38
2.7.7	Analyse av adiponectin .....	40
2.7.8	Analyse av interleukin-10 .....	41
2.8	Beregninger .....	43
2.8.1	Mikrovaskulær endotelfunksjon .....	43
2.8.2	C-peptid til glukose, kreatinin ratio .....	45
2.8.3	Insulinsekresjon .....	45
2.8.4	Insulinsensitivitet .....	45
2.8.5	Glomerulær filtrasjonsrate .....	46
2.9	Adherence .....	46
2.10	Statistikk .....	46
2.10.1	Antall pasienter .....	46
2.10.2	Statistisk analysemetode .....	47
<b>3</b>	<b>Resultater</b> .....	<b>48</b>
3.1	Pasienter .....	48
3.2	Prøvetaking .....	49
3.2.1	Immunsuppressiv behandling .....	49



3.2.2	Biokjemiske analyser av blod og urin .....	51
3.2.3	Kroppsmål og blodtrykk.....	54
3.3	Oral glukosetoleransetest.....	55
3.4	Hjemmemåling av blodsukker .....	56
3.5	C-peptid og beregning av CPGCR .....	57
3.6	Insulinsekresjon og -sensitivitet .....	58
3.6.1	Insulinsekresjon.....	58
3.6.2	Insulinsensitivitet .....	59
3.7	Mikrovaskulær endotelfunksjon .....	60
3.8	Mikro-CRP .....	61
3.9	sTNFR-1 .....	61
3.10	VCAM-1 .....	62
3.11	Adiponectin.....	62
3.12	IL-10 .....	62
3.13	Adherence .....	63
3.14	Bivirkninger .....	63
<b>4</b>	<b>Diskusjon</b> .....	<b>64</b>
4.1	Oral glukosetoleransetest.....	64
4.2	Insulinsekresjon og – sensitivitet.....	66
4.3	Mikrovaskulær endotelfunksjon .....	67
4.4	Sikkerhet og toleranse .....	69
4.5	Effekt av sitagliptin på kardiovaskulær risiko/ESRD.....	71
4.6	Styrker og begrensninger.....	72
<b>5</b>	<b>Konklusjon</b> .....	<b>73</b>
	<b>Litteraturliste</b> .....	<b>75</b>
	Appendiks A: Studien .....	82
	Appendiks B: Individuelle data.....	105
	Appendiks C: Poster Vintermøtet 2012 .....	119

## Summary in English

*Introduction:* Renal transplant recipients suffer to a high degree of cardiovascular disease such as; hypertension, dyslipidemia, endothelial dysfunction as well as impaired glucose tolerance (IGT)/new-onset diabetes after transplantation (NODAT). They have a higher mortality rate than the general population, mainly due to cardiovascular disease. Treating diabetes in renal transplant recipients and in patients with renal failure represents a challenge. Sitagliptin (Januvia®) is a dipeptidylpeptidase-4 inhibitor (DPP-4 inhibitor) that increases systemic levels of the incretin hormones glucagon like peptid-1 (GLP-1) and glucose dependent insulintropic peptid (GIP), since these hormones are hydrolyzed by DPP-4. Indirectly sitagliptin hence stimulates insulin secretion and inhibits glucagon release, two central mechanisms in IGT/NODAT. Recent research indicates that sitagliptin also reduces inflammatory responses *in vitro*. This is of potential interest since it has previously been shown that systemic markers of inflammation are associated with negative cardiovascular effects in transplanted patients.

*Methods:* In a prospective, open, randomized, controlled, cross-over study we have included 25 patients with IGT/NODAT to receive sitagliptin (dose adjusted to renal function) or no treatment for 4 weeks each. Main inclusion criteria were adult renal transplant recipients followed for more than 1 year post transplant with stable renal function and stable prednisolone dose, who were in need of (additional) oral anti-diabetic treatment. Patients with severe liver disease, estimated GFR < 25 mL/min/1.73 m<sup>2</sup>, pregnant/nursing mothers and patients on insulin treatment were excluded. Oral glucose tolerance test (OGTT) for the estimation of insulin secretion and sensitivity, C-peptide to glucose, creatinine ratio (CPGCR) for renal function adjusted insulin secretion and Laser-Doppler flowmetry for determination of endothelial function were performed before and after each treatment phase. Inflammatory markers were analyzed with commercially available ELISA-kits.

*Results:* The average age of the included patients were 63.6±10.9 years (16 male and 9 female). They were studied 3.5±5.3 years after transplantation, and immunosuppressive treatment was cyclosporine, tacrolimus or everolimus together with prednisolone and/or mycophenolate. Five patients received glipizide and two glimepiride for treatment of NODAT prior to inclusion. Treatment with sitagliptin was followed by a significant decline in fasting

and postprandial blood glucose following OGTT and an increase in insulin secretion and CPGCR. Home assessments of blood glucose showed significant reductions in blood glucose throughout the day. Furthermore, no relevant effect was demonstrated on endothelial function or plasma markers for cardiovascular risk. No serious adverse events were observed.

*Conclusion:* This is the first study where sitagliptin is tested in renal transplant recipients. The drug was well tolerated and may be a good alternative for treating NODAT in renal transplant recipients not in need of insulin treatment.

# Sammendrag

*Introduksjon:* Nyretransplanterte pasienter er i stor grad utsatt for kardiovaskulære sykdommer som hypertensjon, dyslipidemi, endoteldysfunksjon samt nedsatt glukosetoleranse (IGT)/nyoppstått diabetes etter transplantasjon (NODAT). Disse pasientene har en høyere risiko for prematur kardiovaskulær sykdom og død enn den generelle populasjonen. Behandling av diabetes i nyretransplanterte pasienter samt pasienter med nyresvikt representerer en utfordring. Sitagliptin (Januvia®) er en dipeptidylpeptidase-4-hemmer (DPP-4-hemmer) som øker de systemiske nivåene av inkretinhormonene glukagonlignende peptid-1 (GLP-1) og glukoseavhengig insulinotropt peptid (GIP), siden disse hormonene hydrolyseres av DPP-4. Sitagliptin stimulerer dermed insulinsekresjon og hemmer glukagonfrigjøring indirekte, og dette er to sentrale mekanismer som er svekket ved IGT/NODAT. Nylig forskning indikerer at sitagliptin også reduserer inflammasjonsresponser *in vitro*. Dette er av potensiell interesse, da det tidligere er vist at systemiske inflammasjonsmarkører er assosiert med negative kardiovaskulære effekter i transplanterte pasienter.

*Materialer og metoder:* 25 pasienter med IGT/NODAT ble inkludert i en prospektiv, åpen, randomisert, kontrollert, kryss-over-studie bestående av fire uker med sitagliptinbehandling (dose justert etter nyrefunksjon) og fire uker uten behandling (kontrollperiode). Hovedinklusionskriteriene var voksne nyretransplanterte pasienter fulgt mer enn ett år etter transplantasjon, med stabil nyrefunksjon og stabil prednisolondose, som hadde behov for (ekstra) antidiabetisk behandling. Pasienter med alvorlig leversykdom, estimert GFR < 25 mL/min/1,73 m<sup>2</sup>, gravide og pasienter på insulinbehandling ble ekskludert. Oral glukosetoleransetest (OGTT) for estimering av insulinsekresjon og – sensitivitet, C-peptid til glukose, kreatinin ratio (CPGCR) for estimering av insulinsekresjon justert for nyrefunksjon og Laser-Doppler flowmetri for bestemmelse av endotelfunksjon, ble utført før og etter hver studieperiode. Inflammasjonsmarkører ble analysert med ELISA-kit.

*Resultater:* Gjennomsnittsalderen ved inklusjon var 63,6±10,9 år (16 menn og 9 kvinner), og gjennomsnittlig tid siden transplantasjon var 3,5±5,3 år. Den immunsuppressive behandlingen bestod av ciklosporin, tacrolimus eller everolimus sammen med prednisolon og/eller mykofenolat. Fem av pasientene stod på glipizid og to på glimepirid for behandling av NODAT før inklusjon. Etter sitagliptinbehandling ble det observert en signifikant reduksjon i

både fastende og postprandial blodglukose ved OGTT samt en signifikant økning i både insulinsekresjon og CPGCR. Hjemmemåling av blodsukker viste at sitagliptin reduserte fastende og postprandial blodglukose gjennom hele døgnet. Studien viste ikke relevante effekter av sitagliptin verken på endotelfunksjon eller plasmamarkører for kardiovaskulær risiko. Ingen alvorlige bivirkninger ble observert.

*Konklusjon:* Dette er den første studien hvor sitagliptin utprøves på nyretransplanterte pasienter. Medikamentet var generelt godt tolerert og representerer et verdifullt alternativ for behandling av NODAT i denne type pasienter som ikke har behov for insulinbehandling.

# Forkortelser

ACh	acetylolin
AEs	“adverse events”
ALAT	alanin amino transferase
ASAT	aspartat amino transferase
AU	arbitrære enheter
AUC	areal under kurven
AV	arteriovenøs
BMI	kroppsmasse indeks
c-AMP	“cyclic adenosine monophosphate”
CAV	“cardiac allograft vasculopathy”
CPGCR	“C-peptid to glucose, creatinine ratio”
CMV	cytomegalovirus
CNI	kalsineurinhemmer
CrCl	kreatinin clearance
CRP	C-reaktivt protein
CsA	Ciklosporin A
CVD	“cardiovascular disease”
CYP	cytokrom P450
DD	avdød donor
DM	diabetes mellitus
DMT2	diabetes mellitus type 2
DPP-4	dipeptidylpeptidase-4
EDTA	etylendiamintetraeddiksyre
ELISA	“enzyme-linked immunosorbent assay”
eNOS	endotelcelle-nitrogenmonoksid-syntase
ESRD	“end stage renal disease”
ET-1	endotelin
GFR	glomerulær filtrasjonsrate
GIP	glukoseavhengig insulinotropt polypeptid
GLP-1	glukagonlignende peptid-1
Hb	hemoglobin

HbA1c	glykosylert hemoglobin
HCV	hepatitt-C virus
HDL	“high density lipoprotein”
HLA	humane leukocyt antigener
HRP	“horse-radish peroxidase”
ICAM-1	“intercellular adhesion molecule-1”
IFG	“impaired fasting glucose”
IGT	“impaired glucose tolerance”/nedsatt glukosetoleranse
KI	konfidensintervall
IL-10	interleukin-10
ISI	insulinsensitivitetsindeks
LD	levende donor
LDF	Laser-Doppler flowmetri
LDL	“low density lipoprotein”
MACE	“major cardiovascular events”
mCRP	mikro-CRP
MMF	mykofenolat mofetil
mTOR	”mammalian target of rapamycin”
Na	natrium
NaCl	natriumklorid
NO	nitrogenmonoksid
NODAT	nyoppstått diabetes mellitus etter transplantasjon
OGTT	oral glukosetoleranasetest
OD	optisk tetthet
OUS	Oslo Universitetssykehus
Peak	maksimal flux-verdi for blodperfusjon
PORH	postokklusiv reaktiv hyperemi
PTDM	posttransplantasjonsdiabetes mellitus
RCF	”relative centrifugal force”
Rh	reaktiv hyperemi
ROS	reaktive oksygenspesier
RRT	“renal replacement therapy”
SD	“standard deviation”

SEM	“standard error of the mean”
sTNFR-1	“soluble tumor necrosis factor receptor-1”
Tac	tacrolimus
TMB	3,3'-5,5'-tetrametylbenzidin
TNF <sub>α</sub>	“tumor necrosis factor-α”
Tx	transplantasjon
VLDL	“very low density lipoprotein”
VCAM-1	“vascular cell adhesion molecule-1”
WHO	verdens helseorganisasjon



# 1 Introduksjon

Alle pasienter med kronisk nyresykdom har en økt risiko for prematur kardiovaskulær sykdom og død. Risikoen reduseres etter nyretransplantasjon til tross for bruk av immunsuppressive legemidler, men er fortsatt tre til fem ganger høyere enn i den generelle populasjonen. Nyretransplanterte pasienter har i tillegg økt risiko for malign sykdom og infeksjon, på grunn av svekket immunforsvar. Sammen med kreft er kardiovaskulære sykdommer den hyppigste dødsårsaken i denne populasjonen. Utvikling av nyoppstått diabetes etter transplantasjon (NODAT), øker risikoen for prematur kardiovaskulær sykdom og død ytterligere [1, 2].

## 1.1 Aktiv nyresviktbehandling

Aktiv nyresviktbehandling er aktuelt når en kronisk nyresvikt ikke lenger kan behandles på en tilstrekkelig måte med farmakologiske midler. Ved aktiv nyresviktbehandling (også kalt aktiv uremibehandling) erstattes nyrefunksjonen enten ved dialysebehandling eller ved transplantasjon av nyre. Fellesbetegnelsen for dette er renal substitusjonsterapi ("renal replacement therapy"; RRT) [3]. I løpet av 2010 ble totalt 505 nye pasienter inkludert i RRT i Norge [4].

### 1.1.1 Nyretransplantasjon

Nyretransplantasjon vil være målet for de fleste dersom en velger å starte aktiv behandling. Transplantasjon gir best livskvalitet, er mest økonomisk og gir best overlevelse [3]. I prinsippet tilbys transplantasjon til alle pasienter som anses å dra nytte av det, uten strenge øvre eller nedre aldersgrenser [4], men flere faktorer kan bidra til at transplantasjon ikke kan gjennomføres. Eksempler på dette er forekomst av antistoffer mot fremmede vevstypeantigener (humane leukocyt antigen, HLA) eller at transplantasjon medfører for høy risiko for individet (alvorlig sykdom eller høy alder). For enkelte pasienter er transplantasjon utelukket fordi de ikke kan settes på immundempende behandling. Dette gjelder blant annet pasienter med aktive eller kronisk residiverende infeksjonstilstander, der immunsuppresjon kan gi oppbluss av infeksjonen [3].

Nyretransplantasjon kan utføres med et organ fra avdød (DD) eller levende donor (LD). I Norge er det generell enighet om at en skal vurdere muligheten for LD-transplantasjon før pasienten vurderes for nyretransplantasjon med nyre fra avdød. Beslektet giver er vanlig kilde ved LD-transplantasjoner, men ubeslektet giver benyttes også i større grad enn tidligere [3].

Fordelene ved bruk av nyre fra LD er flere. I og med at ventetiden er kortere, gir dette økt mulighet til å kunne oppnå predialytisk transplantasjon, det vil si at pasienten transplanteres før det blir nødvendig med dialysebehandling. Dette ser ut til å kunne bedre transplantatoverlevelsen. En annen fordel er at nyrefunksjonen kommer i gang umiddelbart etter transplantasjonen, noe som bedrer langtidsresultatene. Transplantasjoner mellom søsken som deler de samme vevstypene fra foreldrene, dvs. har 0 haplotype ulikhet (mis-match), gir særlig gode resultater. Dette finnes hos én av fire søsken, mens halvparten av søsken har 1 haplotype ulikhet, og en fjerdedel har 2 haplotype ulikheter [3].

I 2011 ble totalt 302 pasienter nyretransplantert ved OUS Rikshospitalet (Oslo Universitetssykehus), noe som utgjorde ny rekord. Blant disse ble 30 % transplantert med et organ fra levende donor [5].

Pasienter som står på venteliste for DD-transplantasjon blir prioritert etter vevs- og blodtypeforlikelighet samt hvor lenge de har ventet. Hovedkriteriet er antall ulikheter i vevstype mellom donor og resipient (DR), og tilbudet går først til pasienten som er DR-forlikelig [3]. Ved slutten av år 2011 stod 193 pasienter på aktiv venteliste for et nyretransplantat fra avdød donor, sammenlignet med 224 pasienter ved slutten av år 2010 [5]. Per 31.12.2010 var median ventetid på listen 7,5 måneder [4].

For å finne ut om en pasient er egnet for transplantasjon, utføres en omfattende klinisk undersøkelse. Vurderingen er også med hensyn på om pasienten er adherent, det vil si at en kan anta at de immunsuppressive medikamentene vil bli tatt som forskrevet. Dårlig adherence er en viktig årsak til tap av transplantatet, graftet [3].

Alle transplantasjoner i Norge utføres ved OUS Rikshospitalet. Rikshospitalet er et av de største nyretransplantasjonssentrene i verden og er størst i Europa [3].

### 1.1.2 Immunsuppressiv behandling

Standard immunsuppressiv behandling i Norge består av en kombinasjon av en kalsineurinhemmer (tacrolimus eller ciklosporin), en hemmer av proliferasjonstimulering (mykofenolat, mykofenolat mofetil eller azathioprin) og kortikosteroider (prednisolon). De nyere "mammalian target of rapamycin" (mTOR)-hemmerene, sirolimus eller everolimus, kombineres også i enkelte tilfeller med de ovennevnte legemidlene [6].

Dosene trappes gradvis ned etter transplantasjon til stabile vedlikeholdsdoser. Hovedmålene med immunsuppresjon er å forebygge akutte avstøtninger av transplantatet samt å optimalisere transplantatfunksjon [2, 3].

Bivirkninger av den immunsuppressive behandlingen er blant annet gastrointestinale plager ved bruk av mykofenolat og nefrotoksisitet ved bruk av kalsineurinhemmere, men seponering medfører en større risiko fordi graftet da kan avstøtes. Kortikosteroider bidrar til hypertensjon og osteoporose, i tillegg til at de både disponerer for infeksjoner og maskerer symptomer ved alvorlige infeksjoner [3]. Enkelte immunsuppressive legemidler reduserer funksjonen til pankreatiske  $\beta$ -celler samt perifer insulinsensitivitet. Dette fører til nedsatt insulinsekresjon og forstyrret glukosehomeostase [7]. Bruk av immunsuppressive legemidler hos transplanterte pasienter fører derfor til økt risiko for utvikling av diabetes mellitus.

## 1.2 Nyoppstått diabetes mellitus etter transplantasjon

### 1.2.1 Definisjon og diagnose

Betegnelsen ”nyoppstått diabetes mellitus etter transplantasjon” (NODAT) har nylig erstattet den eldre betegnelsen ”posttransplantasjonsdiabetes mellitus” (PTDM). Begge betegnelsene skiller tilstanden fra tilstedeværelse av sykdommen før transplantasjon [7]. NODAT er en vanlig følgetilstand etter transplantasjon [8-10], men presis veiledning når det gjelder diagnose og behandling av transplanterte pasienter med risiko for å utvikle diabetes har lenge vært manglende [9, 11]. I 2003 publiserte en ekspertkomité retningslinjer for diagnose og behandling av NODAT hos nyretransplanterte pasienter. For at retningslinjene også skulle gjelde for lever- og hjertetransplanterte pasienter, ble de revurdert i 2005 på et internasjonalt ekspertpanel-møte kalt sammen av det internasjonale diabetesforbundet (”International Diabetes Federation”; IDF). Disse retningslinjene anbefaler at definisjon og diagnose av NODAT skal være basert på definisjonen av diabetes mellitus og nedsatt glukosetoleranse (”impaired glucose tolerance”; IGT) fremstilt av Verdens helseorganisasjon (WHO) [11].

**Tabell 1.1:** WHO-kriterier for diagnose av glukosetoleranse og diabetes mellitus [12].

<b>Diabetes</b>		
Fastende plasmaglukose		$\geq 7,0 \text{ mmol/L}$
	<b>eller</b>	
2-timers plasmaglukose*		$\geq 11,1 \text{ mmol/L}$
<b>Impaired Glucose Tolerance (IGT)</b>		
Fastende plasmaglukose		$< 7,0 \text{ mmol/L}$
	<b>og</b>	
2-timers plasmaglukose*		$\geq 7,8 \text{ and } < 11,1 \text{ mmol/L}$
<b>Impaired Fasting Glucose (IFG)/Normal (N)</b>		
Fastende plasmaglukose		<b>IGT:</b> 6,1 til 6,9 mmol/L
		<b>N:</b> $< 6,1 \text{ mmol/L}$
	<b>og</b>	
2-timers plasmaglukose*	<b>hvis målt</b>	$< 7,8 \text{ mmol/L}$

\*Venøs plasmaglukose 2 timer etter oralt inntak av 75 gram glukose (standard glukosetoleransetest), bekreftet ved gjentatt testing på en annen dag.

\*Dersom 2-timers plasmaglukose ikke måles, kan ikke diabetes eller IGT ekskluderes.

WHO besluttet i 2011 at glykosylert hemoglobin (HbA1c) også kunne benyttes som en diagnostisk test for diabetes når HbA1c er  $\geq 6,5$  % [13]. HbA1c reflekterer gjennomsnittlig plasmaglukose over de foregående åtte til 12 ukene. Den mikrovaskulære komplikasjonen retinopati er direkte relatert til glykemisk kontroll [14], og HbA1c predikerer fremtidig utvikling av denne komplikasjonen like sensitivt og spesifikt som de tradisjonelle glukosebaserte kriteriene nevnt i Tabell 1.1 [13]. Dette kriteriet er foreløpig ikke validert for personer som gjennomgår organtransplantasjon med eller uten nyresvikt, og derfor er oral glukosetoleransetest (OGTT) fortsatt gullstandarden for diagnose av NODAT (da en normal HbA1c ikke nødvendigvis indikerer god glykemisk kontroll hos disse pasientene) [14, 15].

### 1.2.2 Insidens

Det har vært vanskelig å bestemme en eksakt insidens av NODAT gjennom årene. I litteraturen rapporteres insidensraten 12 måneder etter transplantasjon for nyretransplanterte pasienter alt fra 2 % til 50 % [7, 10, 15, 16]. Dette kan delvis forklares av at det er benyttet forskjellige studiepopulasjoner med ulike risikofaktorer (f.eks. alder, etnisitet, medisiner) i diverse studier [7, 9, 10, 15-17]. Allikevel har nok mangelen på standard definisjon av NODAT vært hovedårsaken til variasjonen i rapportert insidens av tilstanden [9, 15]. Få studier har fastsatt insidensen av NODAT ved å benytte OGTT som et diagnostisk kriterium i henhold til retningslinjene [15]. I en studie utført ved OUS Rikshospitalet hvor OGTT ble utført på pasienter 10 uker etter nyretransplantasjon, ble det vist at risikoen for å utvikle NODAT nærmest er halvert (fra 20 % til 13 %) i Norge i løpet av perioden 1995-2005 i denne pasientgruppen. Endringer i immunsuppressiv terapi, færre avstøtninger og gjennomsnittlig lavere prednisolondoser er mulige forklaringer på dette [18]. Resultatet fra denne studien kan indikere at insidensen av NODAT er fallende.

Selv om bevisstheten rundt NODAT og viktigheten av tilstanden er økende, er det behov for flere studier for å beskrive insidensen av NODAT med nåværende immunsuppressive regime og dets kliniske innvirkning, samt hvordan tilstanden best kan behandles [17]. Det er også behov for studier med lengre varighet, da den kumulative insidensen av NODAT ser ut til å være høyere ved lengre observasjonstid [15].

### 1.2.3 Patogenese

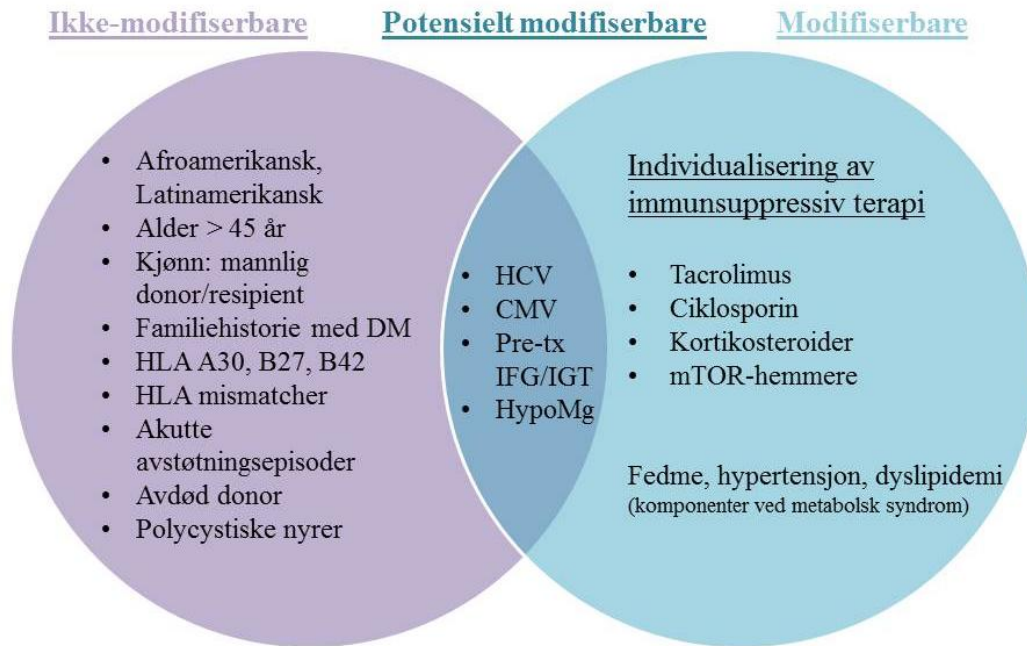
NODAT har en lignende patogenese som diabetes mellitus type 2 (DMT2), ved at tilstanden er forårsaket både av redusert insulinsekresjon og -sensitivitet. Muskel-, lever- og fettceller er resistente mot virkningene til insulin, i tillegg til at de kompensatoriske mekanismene til pankreatiske  $\beta$ -celler til å skille ut mer hormon, ikke er tilstrekkelige til å opprettholde normale blodglukosenivåer [7]. Insulinsensitiviteten i pasienter med NODAT ligger på rundt 60 % av den hos uberørte pasienter. Både fase 1 - og fase 2 insulinsekresjon ved oral glukosetoleransetest (OGTT) er redusert [2]. Hyperglukagonemi er også en viktig del av patogenesen ved DMT2, fordi endogent insulin er viktig for glukoseindusert nedregulering av glukagon etter oralt glukoseinntak. Utilstrekkelig nedregulering av glukagon ved diabetes er primært forårsaket av en utilstrekkelig hemming av funksjonen til pankreatiske  $\alpha$ -celler (ikke ekspansjon av  $\alpha$ -cellenes masse) [19].

I likhet med DMT2 er NODAT relatert til genetiske faktorer, fedme, hypertensjon og dyslipidemi, men NODAT skiller seg noe fra DMT2 ved noen viktige risikofaktorer [15]. For det første utgjør bruken av visse immunsuppressive legemidler en risikofaktor for utvikling av NODAT. Dette medfører at tilstanden delvis kan reverseres ved å redusere eller revidere den immunsuppressive doseringen [17]. For det andre representerer behandling av NODAT visse utfordringer, da nyretransplanterte pasienter alltid har redusert nyrefunksjon (som oftest  $\text{GFR} < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$ ). Dette begrenser hvilke antidiabetiske medikamenter som kan benyttes, i tillegg til at en ikke ønsker interaksjoner med den immunsuppressive behandlingen [15].

### 1.2.4 Risikofaktorer for NODAT

Risikofaktorer for å utvikle NODAT kan deles inn i ikke-modifiserbare, modifiserbare og potensielt modifiserbare risikofaktorer. Kategorien ikke-modifiserbare risikofaktorer kan hjelpe med å identifisere individer med høy risiko, mens de to siste kategoriene kan brukes i forebyggingen og behandlingen av NODAT [9]. For å begrense omfanget av NODAT er det viktig at pasienter som har risiko for å utvikle tilstanden identifiseres tidlig, ideelt sett før transplantasjon. Dette vil være til hjelp for å redusere morbiditet og mortalitet, da utfallet både for pasienten og transplantatet optimaliseres [1].

Flere risikofaktorer for NODAT er de samme som ved tradisjonell DMT2 i den generelle befolkningen. Disse inkluderer alder, etnisitet, genetiske faktorer, fedme, nedsatt glukosemetabolisme, familiær historie av diabetes, mannlig kjønn og tilstedeværelse av Hepatitt C-virus. Men flere andre faktorer er unike for den nyretransplanterte populasjonen, herunder type immunsuppressive legemiddelregime [1, 15, 17]. Risikofaktorer for NODAT er oppsummert i Figur 1.1.



**Figur 1.1: Risikofaktorer for NODAT, modifisert fra [9].**

**Forkortelser:** DM, Diabetes mellitus; HCV, Hepatitt C-virus; CMV, cytomegalovirus; Pre-tx, før transplantasjon; IFG, "Impaired Fasting Glucose"; IGT, "Impaired Glucose Tolerance"; HypoMg, hypomagnesemi.

### ***Ikke-modifiserbare risikofaktorer***

Når det gjelder etnisitet har pasienter med Kaukasisk opprinnelse den laveste risikoen for NODAT. Pasienter med Afroamerikansk og Latinamerikansk opprinnelse har høyest risiko, med henholdsvis 68 % og 35 % økning i utviklingen av NODAT [20]. Årsakene til dette har delvis blitt forklart på bakgrunn av forskjeller i farmakokinetikk og diabetogene effekter av immunsuppressiva samt kulturelle forskjeller i livsstil [9]. Alder er en ikke-modifiserbar risikofaktor, hvor resipienter som er eldre enn 45 år ved transplantasjonstidspunktet har mer enn dobbelt så stor risiko for å utvikle NODAT enn yngre resipienter [21].

Tilstedeværelse av visse humane leukocyt-antigener (HLA) som HLA A30, B27 og B42, økende HLA mismatcher; DR-mismatch, nyre fra avdød donor og akutte avstøtningsepisoder utgjør også høyere risiko [9]. Polycystisk nyresykdom har vært foreslått å gi en økt risiko for utvikling av NODAT i noen studier [22, 23], men ikke i andre [24, 25].

### ***Potensielt modifiserbare risikofaktorer***

Hjelmesæth *et al.* har studert sammenhengen mellom cytomegalovirus (CMV)-infeksjon og utvikling av NODAT. De fant at pasienter med aktiv CMV-infeksjon hadde en signifikant lavere median insulinsekresjon, noe som kan forklares ved at dette  $\beta$ -herpes viruset induserer proinflammatoriske cytokiner som leder til funksjonell forstyrrelse av pankreatiske  $\beta$ -celler [26]. Hepatitt C virus (HCV)-infeksjon er hovedårsaken til leversykdom etter nyretransplantasjon. HCV-positive pasienter har høyere risiko for å utvikle proteinuri, glomerulær nefritt og NODAT [27]. Mekanismen bak HCV-assosiert NODAT er uklar, men kan relateres til økt insulinresistens [28]. Det er tenkelig at risikoen for å utvikle NODAT kan reduseres ved å behandle HCV før transplantasjon [1, 9]. Hypomagnesemi er en hyppig komplikasjon rett etter transplantasjon og er særlig assosiert med bruken av kalsineurinhemmere (CNI). I en retrospektiv studie for perioden 2002-2008 ble denne sammenhengen bekreftet. Hypomagnesemi som er assosiert med insulinresistens, ble funnet å være en uavhengig prediktor for utvikling av NODAT i nyretransplanterte pasienter [29].

Nedsatt glukosemetabolisme før nyretransplantasjon er en risikofaktor for å utvikle NODAT i seg selv. Joss *et al.* fant at pasienter med gjennomsnittlig glukosekonsentrasjoner  $> 5,5$  mmol/L før nyretransplantasjon hadde høyere risiko for å utvikle NODAT. Det ble i tillegg observert en signifikant økning i mortalitet når gjennomsnittlig glukosekonsentrasjon før transplantasjon var  $> 6$  mmol/L [30]. En mulig mekanisme for utvikling av NODAT hos transplanterte pasienter, kan være nedsatt eksponering av glukose til perifere muskler. I en studie utført ved OUS Rikshospitalet ble det funnet en signifikant sammenheng mellom endoteldysfunksjon og insulinresistens i normoglykemiske nyretransplanterte pasienter. Endoteldysfunksjon begrenser blodperfusjonen til perifere muskler, og dette kan potensielt føre til begrenset utnyttelse av glukose i muskulaturen. Voytovich *et al.* viste i denne studien at endoteldysfunksjon kan forklare omtrent 17 % av variasjonen i insulinsensitivitet hos nyretransplanterte pasienter [31].



### ***Modifiserbare risikofaktorer***

Det er tidligere estimert at immunsuppressive legemidler er ansvarlige for 74 % av risikoen for utvikling av NODAT. Dette gjelder kortikosteroider (prednisolon), kalsineurinhemmerne (CNIs) tacrolimus (Tac) og ciklosporin (CsA) samt mTOR-hemmere (sirolimus og everolimus). Mykofenolat mofetil (MMF) har ikke vært relatert til utviklingen av NODAT i kliniske studier så langt [15]. Tvert imot er det erfart en økt insidens av NODAT hos resipienter som ikke behandles med MMF eller azathioprin. Det er ikke klarlagt om dette skyldes at disse medikamentene har direkte fordelaktige effekter på glukoseintoleranse, eller de lavere dosene av kortikosteroider og/eller CNIs som kan forskrives ved samtidig bruk av disse medikamentene [7]. Diabetogene effekter av ulike immunsuppressiva beskrives mer i avsnitt 1.2.5.

Fedme er vist å være assosiert med utvikling av NODAT i de fleste studier [9]. Shah *et al.* studerte pasienter fulgt gjennomsnittlig et år etter transplantasjon og fant at risikoen for å utvikle NODAT økte 1,5-foldig for overvektige pasienter (BMI 25-30 kg/m<sup>2</sup>) og nesten tofoldig for pasienter med fedme (BMI > 30 kg/m<sup>2</sup>) [32]. Den presise rollen til komponenter ved metabolsk syndrom i utviklingen av NODAT er ikke fullstendig definert, men tidlig identifisering og behandling av metabolske risikofaktorer (f.eks. fedme, dyslipidemi, hypertensjon) kan redusere individuell risiko [9].

### **1.2.5 Diabetogene effekter av immunsuppressiva**

#### ***Kalsineurinhemmere (CNIs)***

Kalsineurin er en fosfatase som er viktig for optimal vekst og funksjon av pankreatiske  $\beta$ -celler. Både ciklosporin (CsA) og tacrolimus (Tac) hemmer kalsineurinsignalisering og bidrar i utviklingen av NODAT gjennom en doseavhengig og delvis reversibel inhibisjon av pankreatisk  $\beta$ -cellefunksjon, som fører til nedsatt insulinsekresjon [17]. Hjelmæsæth *et al.* viste at kortidsbehandling med høye doser CsA, som benyttes etter transplantasjon, førte til en signifikant reduksjon i 2.fase-insulinsekresjon (-30 %,  $p=0,045$ ) [33]. CNIs fører videre til svekket genekspressjon av insulin og fremmer perifer insulinresistens, antagelig proporsjonalt med hvor potent substansene hemmer kalsineurinaktivitet. Svekket insulinfrigjøring oppstår derfor hyppigere hos pasienter som behandles med det mer potente legemiddelet Tac sammenlignet med CsA [7]. Kliniske studier som har sammenlignet insidensen av NODAT i pasienter behandlet med CsA versus Tac, har vist at Tac mer konsekvent har større

diabetogen effekt [9]. En annen mulig forklaring på dette er at det spesifikke bindingsproteinet for Tac ("FKBP-12") er høyt konsentrert i pankreatiske  $\beta$ -celler, mens bindingsproteinet for CsA ("cyclophilin") hovedsakelig er lokalisert i hjerte, lever og nyrer [15]. Dette er trolig grunnen til at CsA er assosiert med mer hypertensjon, dyslipidemi og nyresvekkelse.

### **Kortikosteroider**

Den diabetogene effekten av kortikosteroider (prednisolon) er velkjent, og risikoen for å utvikle NODAT de første seks månedene etter transplantasjon er assosiert med høye doser prednisolon [15]. Hjelmæsæth *et al.* har tidligere vist at risikoen øker med 5 % for hver 0,01 mg/kg økning i dose [34]. Kortikosteroider induserer insulinresistens ved å stimulere hepatisk glukoneogenese og svekke perifert glukoseopptak. Det er anbefalt å senke prednisolondosen til 5 mg daglig i løpet av de første to månedene etter transplantasjon, da insulinsensitiviteten ikke forbedres ytterligere under denne dosen [35]. Steroidseponering er generelt ikke anbefalt på grunn av risiko for akutte avstøtningsepisoder [15].

Prednisolon utøver store interindividuelle forskjeller i farmakokinetikk, og medikamentets diabetogene effekter hos nyretransplanterte pasienter forstyrres av samtidig bruk av CNIs. Bergrem *et al.* utførte en studie på nyretransplanterte pasienter i en CNI-fri setting. De fant at høye glukosetopper etter OGTT var assosiert med høye nivåer av ubundet serum prednisolon, og ikke med prednisolondosen i seg selv [36].

### **mTOR-hemmere**

mTOR-hemmere er en klasse av legemidler som hemmer en protein kinase kalt "mammalian target of rapamycin (mTor)". mTOR integrerer signaler fra blant annet aminosyrer, næringsstoffer, cytokiner, hormoner og vekstfaktorer for å fremme cellevekst. Det er vist at sirolimus fremmer apoptose av pankreatiske  $\beta$ -celler, reduserer insulinsekresjon under glukosestimulering i tillegg til å svekke hepatisk glukosemetabolisme [7]. Kliniske studier har vist at sirolimus ikke bare induserer insulinresistens, men også hypertriglyseridemi og høye kolesterolnivåer. Effekten på hypertriglyseridemi skyldes sannsynligvis endringer i signalveiene til insulin som induserer økt hepatisk syntese av triglyserider samt økt sekresjon av VLDL (very low density lipoprotein)-kolesterol. Det er sannsynlig at everolimus har samme effekter i organtransplanterte pasienter [15].

### ***Basiliximab***

Basiliximab er et interleukin (IL)-2 antistoff som indirekte undertrykker proliferasjonen av T-lymfocytter, og dermed forårsaker tap av regulerende T-celler. Dette medikamentet kan derfor indirekte påvirke  $\beta$ -cellefunksjonen og føre til nedsatt glukosehomeostase i pasienter som også mottar steroider og CNIs [7]. Aasebø *et al.* viste denne assosiasjonen i en studie på nyretransplanterte pasienter utført ved OUS Rikshospitalet. Bruk av basiliximab som induksjonsterapi førte til at 51,5 % av pasientene utviklet NODAT, IGT eller IGF mot 36,9 % i gruppen uten induksjonsterapi [10].

### **1.2.6 Behandling av NODAT**

Retningslinjer for behandling av DMT2 anbefaler livsstilsendringer og/eller bruk av orale antidiabetikum eller insulin [37]. Hos nyretransplanterte pasienter med NODAT vanskeliggjøres behandlingen da de har redusert nyrefunksjon og benytter immundepende legemidler med potensielle interaksjonsproblemer. Disse pasientene har i tillegg ofte uttalt aterosklerose og høy kardiovaskulær risiko. Det er derfor spesielt viktig at behandling av diabetes hos denne populasjonen ikke fører til bivirkninger som øker kardiovaskulære risikofaktorer som vektøkning og hyppige hypoglykemiske episoder [15].

Biguanidderivatet metformin virker ved å øke insulinsensitiviteten i leveren som resulterer i redusert hepatisk glukoseproduksjon, og er anbefalt førstelinjepreparat for behandling av DMT2 [15, 38]. I motsetning til tradisjonelle hypoglykemiske medikamenter som sulfonylurea og insulin, fører ikke bruk av metformin til økt kroppsvekt eller hypoglykemiske episoder. Metformin sekreseres raskt og uendret via renal eliminasjon, og redusert nyrefunksjon kan derfor forårsake metforminakkumulering og livstruende melkesyreacidose ( $\text{pH} < 7,20$  og/eller plasmalaktatnivåer  $> 4 \text{ mmol/l}$ ). Bruk av metformin er derfor ikke anbefalt hos nyretransplanterte pasienter, da de generelt har en  $\text{GFR} < 60 \text{ mL/min/1,73 m}^2$  [15, 39].

Sammen med insulin er sulfonylurea anbefalt som andrelinjepreparat for behandling av DMT2. Tradisjonelle sulfonylurea som glipizid (Mindiab<sup>®</sup>) og glimepirid (Amaryl<sup>®</sup>) induserer økt insulinsekresjon via en glukoseuavhengig mekanisme, og kan derfor forårsake hypoglykemiske episoder. Avhengig av den kardiovaskulære risikoen til pasienten, kan gjentatte hypoglykemiske episoder øke risikoen for kardiovaskulære hendelser og død. Bruk av sulfonylurea fører som nevnt til vektøkning, og medikamentene mister den

glukoseregulerende effekten over tid dersom de brukes som monoterapi. Nyretransplanterte pasienter kan trygt bruke disse medikamentene dersom de følges opp regelmessig for hypoglykemiske episoder [15].

Glinider er korttidssvirkende antidiabetika som har en raskt innsettende effekt, noe som forårsaker tidlig insulinfrigjøring fra pankreas. Dette reduserer risikoen for langvarig hyperinsulinemi og dermed også hypoglykemi. Både nateglinid (Starlix<sup>®</sup>) og repaglinid (NovoNorm<sup>®</sup>) er vist å senke blodglukosen effektivt hos nyretransplanterte pasienter med NODAT [40]. CsA og Tac metaboliseres av cytokrom P450 (CYP)-enzymet 3A4, men CsA er en mer potent hemmer av dette isoenzymet [7]. CsA kan derfor øke plasmanivåene av repaglinid, siden begge disse medikamentene metaboliseres av CYP 3A4. Nateglinid metaboliseres av CYP 2C9 og interagerer ikke med CNIs [15].

Det er begrenset hvilke medikamenter som er optimale i behandlingen av NODAT hos nyretransplanterte pasienter. Dette viser behovet for å teste ut sikkerhet for nye antidiabetiske medikamenter i denne populasjonen.

## **1.3 Kardiovaskulær risikoprofil hos nyretransplanterte pasienter med NODAT.**

Det er kjent at NODAT er assosiert med økt kardiovaskulær risiko og dødelighet av enhver årsak. Utover det første året etter transplantasjon, er NODAT en viktigere faktor enn akutte avstøtningsepisoder av transplantat med tanke på pasientoverlevelse. NODAT er generelt assosiert med en dobling i dødelighet av enhver årsak og en tredobling i kardiovaskulære hendelser [2].

### **1.3.1 Endotelet og endoteldysfunksjon**

Endotelet utgjør en funksjonell barriere mellom åreveggen og blodstrømmen, og er hovedregulatoren for vaskulær homeostase [41]. Endotelceller opprettholder vaskulær elastisitet og lave nivåer av oksidativt stress ved å frigjøre endotelderiverte vasodilatorer som nitrogenoksid (NO), bradykinin og prostasyklin (PGI<sub>2</sub>), i tillegg til å kontrollere den lokale aktiviteten av vasokonstriktorer som endotelin (ET-1) og angiotensin II [42].

Endotelcellene kan skades av ulike risikofaktorer (tobakk/røyking, modifisert/oksidert lipoprotein) slik at det oppstår endoteldysfunksjon. Dette kan føre til endret produksjon av mange ulike substanser, som i sin tur kan forårsake vasokonstriksjon samt økt tendens til koagulasjon og trombose [43]. Endoteldysfunksjon er definert som redusert biotilgjengelighet av NO og/eller en ubalanse i den relative fordelingen av endotelderiverte vasodilatorer og vasokonstriktorer, som fører til nedsatt endotelavhengig vasodilatasjon. Flere mediatorer som acetylkolin (ACh), bradykinin, insulin og adiponectin aktiverer endotelcelle-NO-syntase (eNOS), og endoteldysfunksjon oppstår ved redusert respons på disse beskyttende stimulatorene. Endoteldysfunksjon er derfor en vanlig komplikasjon ved diabetes (pga. redusert insulinfrigjøring) og ved fedme (pga. redusert adiponectin) [44].

Flere studier har vist at pasienter med kardiovaskulære risikofaktorer er berørt av endoteldysfunksjon selv uten kliniske tegn på aterosklerose, og det er derfor vist at endoteldysfunksjon er et forstadium til aterosklerose. Ved å måle endotelfunksjon kan tidlige tegn på vaskulære komplikasjoner avdekkes [42]. Det er vist at nedsatt mikrovaskulær respons, målt ved hjelp av Laser-Doppler flowmetri kombinert med iontoforese av ACh, er assosiert med en rekke kardiovaskulære risikofaktorer, inkludert essensiell hypertensjon og diabetes. Nedsatt mikrovaskulær respons på ACh er generelt assosiert med kardiovaskulære

sykdommer og risikofaktorer for disse [45]. Nyretransplanterte pasienter har ofte endoteldysfunksjon, og enkelte studier har rapportert at CsA og Tac forårsaker endoteldysfunksjon i denne pasientgruppen ved å hemme syntesen av NO [46]. Dysfunksjon i endotelet er en reversibel tilstand, og forbedring av endotelfunksjonen er nå et økende primært terapeutisk target [47].

### 1.3.2 Aterosklerose

Aterosklerose er en prosess hvor lipider, kolesterol, inflammasjonsceller og bindevev akkumuleres i åreveggen (aterosklerotisk plakk). De aterosklerotiske forandringene utvikles gradvis over tid og utgjør det patofysiologiske grunnlaget for symptomgivende kardiovaskulær sykdom ("cardiovascular disease"; CVD) som hjerteinfarkt og slag [43, 44]. Aterosklerose forårsaker mer enn 80 % av kardiovaskulær sykdom og -død. Det er nå kjent at aterosklerose er en kronisk inflammatorisk sykdom med flere risikofaktorer som hyperkolesterolemi, dyslipidemi, diabetes, hypertensjon og røyking som alle spiller en rolle i utbredelsen av lokale inflammasjonsresponses [44].

De aterosklerotiske forandringene igangsettes ved oksidasjon av LDL ("low density lipoprotein") i åreveggen. Dette fører til endring av proinflammatoriske egenskaper via økt hepatisk produksjon av akutfaseproteinet C-reaktivt protein (CRP). Proinflammatoriske cytokiner (IL-1 $\beta$  og TNF- $\alpha$ ) frigjøres i respons på CRP, som videre induserer uttrykkelsen av adhesjonsmolekyler som VCAM-1 ("vascular cell adhesion molecule-1") og ICAM-1 ("intercellular adhesion molecule-1"). Dette resulterer i inflammatorisk aktivering av endotelceller. Kontinuerlig frigjøring av cytokiner av aktiverte endotelceller, opprettholder ikke bare inflammasjon og lipidakkumulering i åreveggen, men påvirker også glatte muskelceller, som fører til vasokonstriksjon. Ruptur av ateromatøse plakk kan trigge trombose og resultere i akutt hjerteinfarkt [44, 48].

Insulinresistens er med på å fremme progresjonen av aterosklerose fordi redusert biologisk aktivitet av insulin er assosiert med endoteldysfunksjon, vasokonstriksjon, inflammasjon, trombose og apoptose [49].

### 1.3.3 Markører av interesse i denne oppgaven

#### *C-peptid*

Proinsulin består av en A- og en B-kjede som er koblet sammen og stabilisert av C-peptid. Insulin dannes når C-peptid avspaltes og det oppstår en disulfidbinding mellom A- og B-kjeden. C-peptid frigjøres i ekvimolare mengder med insulin fra pankreatiske  $\beta$ -celler, og er i motsetning til insulin, ikke utsatt for omfattende first pass-metabolisme i lever. Denne markøren fungerer derfor som et nyttig surrogatmål på insulinfrigjøring [50].

C-peptid har lenge vært ansett for bare å ha biologisk funksjon i korrekt insulindannelse, men nylig forskning viser at C-peptid utfører flere pleiotrope effekter, antageligvis via binding til G-proteinkoblede reseptorer [51]. Haidet *et al.* viste nylig at C-peptid har anti-inflammatoriske effekter både i endotelceller og glatte muskelceller i mus utsatt for høye glukosekonsentrasjoner. C-peptid reduserte spesielt høy glukoseindusert oppregulering av adhesjonsmolekylet VCAM-1 samt sekresjon av proinflammatoriske cytokiner [52].

#### *Adiponectin*

Adiponectin, et plasmaprotein som i stor grad uttrykkes og sekreseres av fettvev, er et potent insulinforsterkende hormon som er med i reguleringen av glukose- og lipidmetabolisme [53]. Nylige studier har vist en sammenheng mellom lave plasmakonsentrasjoner av adiponectin og metabolske sykdommer som fedme, diabetes, hypertensjon og dyslipidemi. Det er i tillegg vist at adiponectin spiller en nøkkelrolle i integreringen av inflammatoriske responser samt påfølgende aterosklerose og kardiovaskulære sykdommer. Adiponectin beskytter endotelfunksjonen ved å hindre uttrykkelsen av adhesjonsmolekyler og monocytter som er involvert i aterosklerose. I tillegg øker adiponectin produksjonen av NO i endotelceller, som spiller en viktig rolle i endotelavhengig vasodilatasjon. Det er vist en sammenheng mellom lave plasmakonsentrasjoner av adiponectin og nedsatt endotelfunksjon i pasienter med hypertensjon, DMT2 samt i friske individer [54].

#### *CRP*

Høye plasmakonsentrasjoner av CRP har vært assosiert med økt risiko for slag, hjerteinfarkt og perifer vaskulær sykdom. CRP har derfor blitt en ledende inflammasjonskomponent for å estimere risiko for kardiovaskulær sykdom. Tidligere har det bare vært mulig å måle CRP-konsentrasjoner over 5 mg/mL, men nye analysetekniker gjør det mulig å måle langt lavere

konsentrasjoner. Mikro-CRP (mCRP) er konsentrasjoner av CRP under 5-10 mg/mL, og mCRP benyttes nå som en klinisk markør for pågående inflammasjon ved aterosklerose [55].

### ***TNF- $\alpha$ og sTNFR-1***

Tumor nekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  er en av nøkkelmediatorene som uttrykkes under forskjellige inflammatoriske tilstander og initierer uttrykkelsen av hele spekteret av inflammatoriske cytokiner. Rask-Madsen *et al.* har tidligere demonstrert at TNF- $\alpha$  hemmer både insulinstimulert glukoseopptak og endotelavhengig vasodilatasjon i mennesker [56]. TNF- $\alpha$  uttrykkes i lave konsentrasjoner i det friske hjertet, og er da hovedsakelig lokalisert i endotelet. Signaler som regulerer responser av TNF- $\alpha$  er alle igangsatt ved at TNF- $\alpha$  bindes til enten TNFR-1 eller TNFR-2, som er reseptorer lokalisert på celleoverflater. TNFR-1 kan frigjøres fra cellemembranen og bli en løselig reseptor; sTNFR-1 ("soluble tumor necrosis factor receptor-1") som kan modulere aktiviteten til sirkulerende TNF [48]. Niewczas *et al.* fant nylig en signifikant sammenheng mellom økte konsentrasjoner av sTNFR-1 og risikoen for å utvikle ESRD hos pasienter med DMT2 [57].

### ***VCAM-1***

Arora *et al.* har nylig vist at økte konsentrasjoner av VCAM-1 er assosiert med avansert CAV ("cardiac allograft vasculopathy") hos hjertetransplanterte pasienter [58]. CAV er en alvorlig langtidskomplikasjon som er manifestert av en uvanlig akselerert form for koronar sykdom som påvirker både koronare arterier og vener. Det er foreslått at strategier for å blokkere uttrykkelsen av adhesjonsmolekyler som VCAM-1 kan hjelpe og forhindre kroniske avstøtninger etter transplantasjon [59].

### ***IL-10***

Interleukin (IL)-10 er et potent anti-inflammatorisk cytokin, og lav produksjon av IL-10 er vist å spille en rolle ved metabolsk syndrom og DMT2. Denne sammenhengen er vist ved at serumkonsentrasjoner av total kolesterol, LDL, triglyserider, glukose og HbA1c gradvis reduseres, mens HDL ("high density lipoprotein") gradvis økes når produksjonen av IL-10 øker [60].

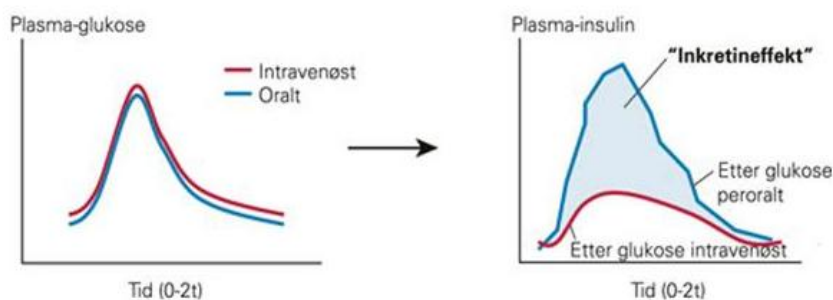


## 1.4 Sitagliptin (Januvia<sup>®</sup>)

Dipeptidylpeptidase-4 (DPP-4) - hemmere er en ny og lovende farmakologisk klasse av glukosesenkende midler. Sitagliptin (Januvia<sup>®</sup>), den første i klassen av DPP-4-hemmere, ble godkjent i USA i 2006 og er nå globalt tilgjengelig for behandling av DMT2 [61].

### 1.4.1 Virkningsmekanisme

Sitagliptin er en oralt aktiv, potent og selektiv DPP-4-hemmer som virker antidiabetisk gjennom å øke konsentrasjonene av aktive inkretinhormoner i plasma [62]. Inkretinsystemet har en viktig rolle i glukosehomeostasen, og de to viktigste signalsubstansene som inngår er glukagonlignende peptid-1 (GLP-1) og glukoseavhengig insulinotropt polypeptid (GIP) [63]. Disse inkretinene sekreseres lokalt fra gastrointestinaltraktus i respons på matinntak og står for opp til 70 % av insulinet som normalt skilles ut i forbindelse med måltid. Det meste av effekten (80 %) medieres via GLP-1 [64]. Betegnelsen ”inkretineffekt” ble opprinnelig benyttet for å beskrive den langt kraftigere insulinstigningen i plasma som ble observert etter oralt inntak av glukose sammenlignet med intravenøs glukoseinfusjon for å gi samme plasma-glukoseprofil. Se Figur 1.2. Denne inkretineffekten er betydelig redusert hos pasienter med DMT2 (fra 70 % til 40 %) sannsynligvis på grunn av redusert sekresjon av GLP-1 samt manglende respons på GIP [63, 65, 66]. Det samme gjelder trolig for pasienter med NODAT.



**Figur 1.2: Illustrasjon av inkretineffekten.** En viss mengde glukose gitt intravenøst gir mindre insulinstigning i plasma enn peroral glukosetilførsel for å gi samme glukosestigning i plasma [63].

GLP-1 er derivert fra proglukagon og syntetiseres i endokrine L-celler lokalisert i slimhinnen i distale ileum og kolon, mens GIP er et 42 aminosyre-peptid som syntetiseres i endokrine K-celler i jejunum [64, 65]. Den raske sekresjonen av inkretinhormonene, på tross av at de syntetiseres distalt i tarmen, stimuleres sannsynligvis av en kombinasjon av nevrogene og endokrine signaler som oppstår i forbindelse med matinntak [63]. GLP-1 og GIP stimulerer glukoseavhengig insulinsekresjon fra pankreatiske  $\beta$ -celler og øker perifer insulinsensitivitet ved å aktivere G-proteinkoblede reseptorer. Inkretinreseptorer er uttrykt på pankreatiske  $\alpha$ - og  $\beta$ -celler og i perifere vev (inkludert sentralnervesystemet, gastrointestinaltraktus, hjertet og lunger), og aktivering av disse øker nivåene av c-AMP. Mer langvarig binding av inkretiner øker nysyntesen av insulin via aktivering av protein kinase A, og det er i tillegg vist at dette fører til økt regenerering av  $\beta$ -cellenes masse. Williams-Herman *et al.* viste at sitagliptin forbedret  $\beta$ -cellefunksjonen relativt til placebo hos pasienter med DMT2 [67]. Behandlinger som både retter seg mot  $\beta$ -celledysfunksjon og insulinresistens kan være effektive for å forebygge eller bremse ned progresjonen av DMT2, og mulig også NODAT.

GLP-1 demper også glukagonsekresjon fra pankreatiske  $\alpha$ -celler, som resulterer i en glukoseavhengig reduksjon i hepatisk glukoseproduksjon. Effekten av GLP-1 på gastrointestinaltraktus og nervesystemet fører til forsinket tømming av magesekken, som igjen resulterer i økt metthetsfølelse, redusert appetittfølelse samt redusert matinntak [63, 65].

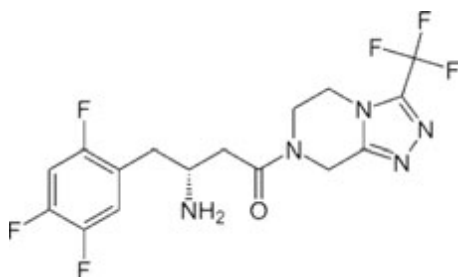
Både GLP-1 og GIP har kort halveringstid (2-3 minutter) da de er utsatt for rask degradering av enzymet DPP-4 til inaktive produkter [62]. Administrering av DPP-4-hemmeren sitagliptin hemmer enzymatisk degradering av disse hormonene, noe som fører til forlenget inkretineffekt og forbedret glukosekontroll. HbA1c-nivåer reduseres med tilnærmet 1 % - poeng ved steady-state plasmakonsentrasjoner av sitagliptin (0,14-1,9  $\mu$ M) [68]. Sitagliptin er vist å redusere både fastende og postprandial glukose. Hepatisk glukoseproduksjon er en viktig faktor for fastende plasmaglukose, så det er derfor sannsynlig at kombinasjonen av økt insulinsekresjon og reduserte glukagonnivåer fører til redusert hepatisk glukoseproduksjon i løpet av natten [62].

Virkningsmekanismen til sitagliptin er fordelaktig siden den stimulerte insulinsekresjonen er glukoseavhengig og dermed ikke oppstår når glukosenivåene er lave. I motsetning til tradisjonelle sulfonylurea, fører derfor bruk av sitagliptin verken til hypoglykemi eller vektøkning, da medikamentet har en glukoseavhengig og vektnøytral glukosesenkende effekt [61].

DPP-4 er en serin protease lokalisert på overflaten av flere celletyper i kroppen. Enzymet er uttrykt i de fleste vev, inkludert nyrene, gastrointestinaltraktus, galletraktus, leveren, placenta, livmoren, prostata, huden samt lymfocytter og monocytter, og er assosiert med immunmodulerende funksjoner [69, 70]. Sitagliptin er en potent og selektiv hemmer av DPP-4 [62]. Siden DPP-4 er medlem av en stor klasse av proteaser, er selektiv hemming av dette enzymet av stor viktighet. DPP-8 - og DPP-9-hemmere har produsert uheldige effekter som gastrointestinal toksisitet og høy dødelighet i dyremodeller [65]. DPP-4-hemmere reduserer DPP-4-aktivitet i plasma med 70-90 % (i over 24 timer) ved terapeutiske doser og gir en klinisk relevant økning i GLP-1-nivåer (1,5- til 4-foldig) [61].

### 1.4.2 Farmakokinetiske egenskaper

Des-fluoro sitagliptin (DFS) er et lite molekyl og medikamentet administreres peroralt da det er oralt tilgjengelig [61]. Den kjemiske strukturen er vist i Figur 1.3.



**Figur 1.3: Kjemisk struktur av DPP-4-hemmeren sitagliptin [71].**

En enkel oral dose på 100 mg sitagliptin er assosiert med en  $T_{max}$  på 4 timer og  $C_{max}$  på 747 nmol/L. Halveringstiden for medikamentet er ca. 10 timer. Den absolutte biotilgjengeligheten til sitagliptin er 87 %, og de farmakokinetiske egenskapene er vist å være like mellom pasienter med DMT2 og friske frivillige [72].

Gjennomsnittlig 87 % av en dose på 100 mg sitagliptin elimineres uforandret via nyrene, mens gjennomsnittlig fekal eliminering utgjør 13 %. Det er vist at 16 % av dosen elimineres som metabolitter (13 % i urinen og 3 % i fæces), noe som indikerer at sitagliptin primært elimineres via nyrene. Cytokrom P450 (CYP) isoenzymet som er ansvarlig for metabolisme av sitagliptin er CYP 3A4 (CYP 2C8 bidrar noe), men CYP-systemet er lite delaktig i metabolismen av sitagliptin. Det er derfor lite sannsynlig med klinisk relevante interaksjoner med dette medikamentet [73].

For å vurdere den potensielle innvirkningen av renal dysfunksjon på de farmakokinetiske egenskapene til sitagliptin, utførte Bergman *et al.* en klinisk studie på 30 pasienter med varierende grad av nyresvikt. Nyrefunksjonen (kreatinin clearance; CrCl) ble delt inn i følgende klasser: normal funksjon (CrCl > 80 mL/min), mild svikt (CrCl 50-80 mL/min), moderat svikt (CrCl 30-50 mL/min), alvorlig svikt (CrCl < 30 mL/min) eller ESRD (end stage renal disease, behov for hemodialyse). Som forventet var AUC<sub>0-∞</sub>-verdiene av en oral dose på 50 mg sitagliptin signifikant høyere i pasientene med nyresvikt. Det anbefales derfor å justere dosen til 50 mg daglig for pasienter med moderat nyresvikt og 25 mg daglig for pasienter med alvorlig nyresvikt eller ESRD [74].

### 1.4.3 Sikkerhetsprofil

Sitagliptin er generelt godt tolerert hos pasienter med DMT2, både som monoterapi [62] og kombinasjonsterapi med andre antidiabetikum [61, 75]. Richard *et al.* har evaluert prevalensen av uønskede medisinske hendelser ("adverse events"; AEs) av sitagliptin fra 19 kliniske studier. Den overordnede prevalensen av AEs var ikke høyere med sitagliptin versus rosiglitason, sulfonylurea eller metformin. Infeksjoner i nese og svelg, hodepine, rygg smerter, magesmerter, smerter i ekstremitetene og gastrointestinale plager som diaré og kvalme var de vanligste rapporterte AEs i placebokontrollerte studier, men de klinisk relevante effektene var minimale [69].

Det ble fremmet bekymringer da registerdata fant en mulig sammenheng mellom bruken av DPP-4-hemmere og utvikling av pankreatitt og pankreaskreft (mulig på bakgrunn av den immunmodulerende effekten av DPP-4-hemming) [76]. Resultater fra randomiserte studier, sammenfattet i en meta-analyse, står imidlertid i kontrast med dette funnet. Meta-analysen fastsatte effekten av DPP-4-hemmere på insidensen av store kardiovaskulære hendelser ("major cardiovascular events"; MACE, inkludert kardiovaskulær død, ikke-fatal hjerteinfarkt og slag og sykehusinnleggelser grunnet koronare syndromer og/eller hjertesvikt) samt kreft og pankreatitt i totalt 53 randomiserte kliniske studier. Meta-analysen fant ingen økt insidens av verken kreft eller pankreatitt assosiert med bruken av DPP-4-hemmere. Det ble i tillegg observert en uventet signifikant lavere risiko for utvikling av MACE, og det ble foreslått at DPP-4-hemmere har en mulig beskyttende effekt mot kardiovaskulære hendelser [77]. Williams-Herman *et al.* har utført en samlet analyse med data fra 19 dobbeltblindede kliniske studier for å vurdere sikkerhet og toleranse ved bruk av sitagliptin i pasienter med DMT2.

Behandling med 100 mg sitagliptin daglig var generelt godt tolerert i kliniske studier opp til to års varighet, og sitagliptin var ikke assosiert med økt risiko for MACE [78]. Det pågår nå en dobbelblindet, randomisert, placebokontrollert, multinasjonal studie under navnet TECOS ("Trial Evaluating Cardiovascular Outcomes With Sitagliptin"). Denne studien har som mål å sammenligne effekten mellom sitagliptin som kombinasjonsterapi versus vanlig antidiabetisk behandling på kardiovaskulære endepunkter i pasienter med DMT2. Totalt 14 000 pasienter vil følges i minimum tre år, med resultater forventet i 2015 [79].

### 1.4.4 Pleiotrope effekter av sitagliptin

Diabetiske tilstander forhøyer reaktive oksygenspesier (ROS), inflammasjonsresponser, endoteldysfunksjon og lipidavleiring i karveggen som fremmer aterosklerose. Det er derfor ønskelig med legemidler som ikke bare kontrollerer blodglukose, men også hemmer kardiovaskulære komplikasjoner [80]. Matsubara *et al.* rapporterte nylig at sitagliptin har en signifikant hemmende effekt på dannelsen av ateromatøse lesjoner i apolipoprotein E-manglende mus [81]. Behandling med sitagliptin gjenopprettet endotelfunksjonen *ex vivo* og reduserte aldring av endotelceller og apoptose *in vitro*. GLP-1-reseptorer er som nevnt uttrykt i forskjellige vev i hjerte-karsystemet, og tidligere studier støtter opp om at DPP-4-hemmere, som øker de aktive nivåene av GLP-1, kan ha direkte hjertebeskyttende effekter uavhengig av glukosesenking [80]. Det er også vist at DPP-4-hemmere kan utøve mulige antiaterogene effekter *in vivo*. Disse inkluderer reduisering av systolisk blodtrykk, bedring i postprandiale lipidparametre, reduisering av CRP-nivåer samt bedring av endoteldysfunksjon [61].

DPP-4-hemmere har lenge vært ansett for å spille en rolle i immunmodulering. Aterosklerose er en immuno-inflammatorisk sykdom, og det er derfor mulig at hemming av DPP-4 modulerer responser som oppstår i ateromatøse lesjoner. Inflammasjon spiller en viktig rolle ved diabetes, ikke bare i karsengen, men også i fettvev og i pankreatiske øyceller. Sitagliptin er vist å redusere inflammasjon i disse vevene i mus, noe som indikerer at medikamentet har anti-inflammatoriske egenskaper som fremmer positive effekter for metabolsk og vaskulær funksjon [70].

## 1.5 Studiens hensikt

Alle nyretransplanterte pasienter har redusert GFR, noe som gjør behandling av diabetes hos denne populasjonen mer kompleks og vanskelig. Utfordringene inkluderer risiko for hypoglykemi, interaksjoner med immunosuppressive medikamenter og langtidseffekter på kardiovaskulær funksjon. Denne studien ble initiert for å undersøke sikkerhet og effekt av en type av antihyperglykemiske medikament, gliptiner, i denne populasjonen.

Studiens primære mål var å undersøke effekten av sitagliptin (Januvia®) på insulinsekresjon hos pasienter som har utviklet diabetes/glukoseintoleranse etter nyretransplantasjon. Medikamentet ble gitt alene eller i tillegg til annen peroral antidiabetisk behandling (glipizid/glimepirid).

Effekt på insulinsensitivitet, blodglukose og endotelfunksjon ble undersøkt som sekundære variabler. I tillegg til disse analysene ble ulike inflammatoriske markører i plasma målt. Dette for å undersøke om sitagliptin endrer den inflammatoriske responsen, og dermed potensielt kan påvirke kardiovaskulær risiko utover den glukosemodifiserende effekten.

Vurdering av sikkerhet med hensyn på både bivirkninger og eventuelle interaksjoner med den immunosuppressive behandlingen til pasientene ble også undersøkt.

## 2 Materialer og metoder

### 2.1 Studiedesign

Denne studien var en prospektiv, åpen, randomisert, kontrollert, kryss-over-studie. Nyretransplanterte pasienter ble inkludert i studien i henhold til følgende kriterier:

#### Inklusjonskriterier:

- Nyretransplanterte pasienter med stabile kreatininverdier og prednisolondose, transplantert minst ett år før inklusjon.
- Pasienter med blodsukker tilsvarende WHO kriterier for diabetes eller nedsatt glukosetoleranse.
- > 18 år.
- Mann, ikke fertil kvinne, eller fertil kvinne som ikke ammer og som avgir negativ graviditetstest.
- Signert informert samtykke.

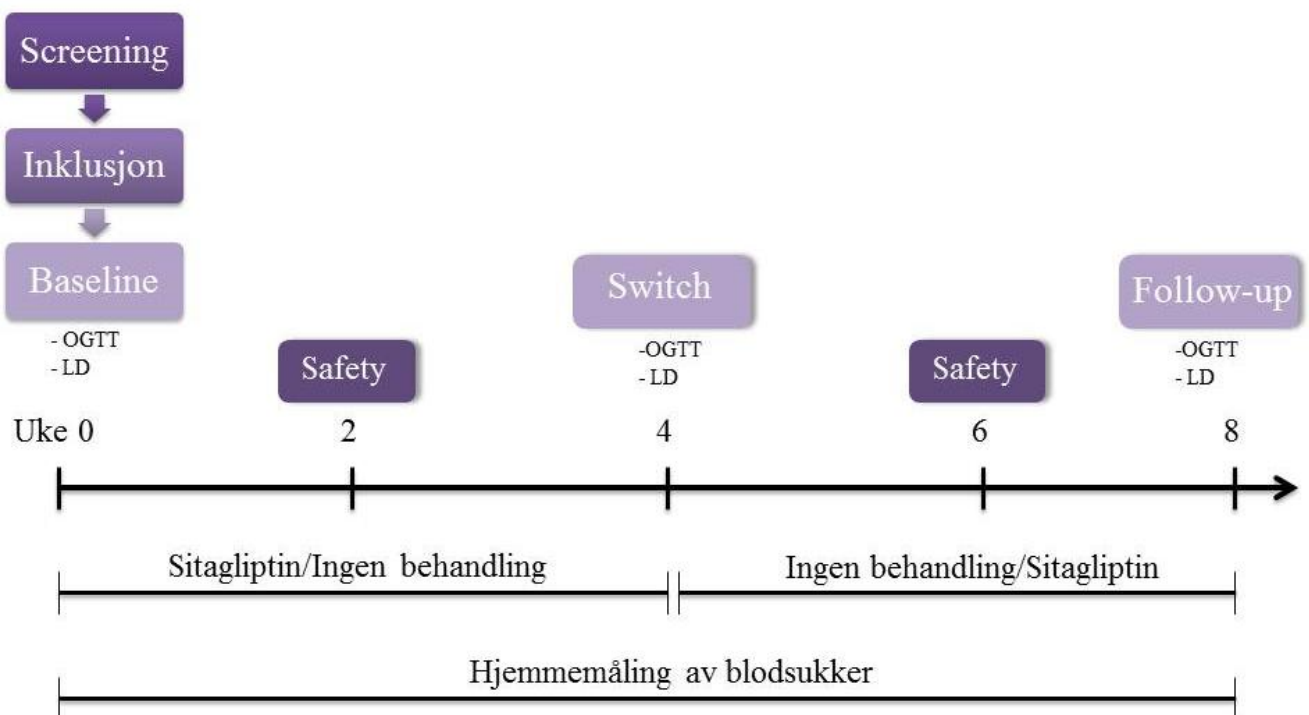
#### Eksklusjonskriterier:

- Insulinbehandling.
- Alvorlig leversykdom.
- Estimert GFR < 25 ml/min/1,73 m<sup>2</sup>.
- Hudtilstander som kan påvirke Laser-Doppler flowmetri undersøkelser.

Studien bestod av totalt åtte uker og pasientene ble randomisert ved trekning til hvilken periode de skulle starte med; enten daglig bruk av sitagliptin de første fire studieukene, etterfulgt av en kontrollperiode på fire nye uker uten behandling, eller motsatt rekkefølge. Sitagliptindosen ble justert i forhold til individuell nyrefunksjon målt på bakgrunn av estimert kreatinin clearance (mL/min), som gir et mål på glomerulær filtrasjonsrate (GFR), og denne ble beregnet samme dag som pasienten startet med medikamentet. Ved GFR  $\geq$  50 mL/min, ble 100 mg sitagliptin gitt daglig, mens dagsdosen ble halvert til 50 mg (1/2 tablett) sitagliptin ved GFR 25-49 mL/min. Pasientenes legemiddelregime ble ellers holdt konstant under hele studien.

I løpet av studien møtte hver enkelt pasient opp til totalt tre undersøkelsesdager på OUS Rikshospitalet. Disse fant sted ved studieoppstart (baseline), etter fire uker (switch) og etter åtte uker (studieslutt/follow-up). Baselineundersøkelser ble utført før første periode med aktiv sitagliptinbehandling/ingen behandling startet. Disse undersøkelsene bestod av blodprøver, urinprøve, blodtrykk, veiing av kroppsvekt, oral glukosetoleransetest (OGTT) og måling av mikrovaskulær endotelfunksjon ved hjelp av Laser-Doppler flowmetri (LDF). Disse undersøkelsene ble repetert og utført på nøyaktig samme måte etter fire og åtte uker. For å sikre at det var trygt for nyretransplanterte pasienter å bruke sitagliptin, ble to sikkerhetskontroller lagt til uke to og uke seks i studien. Disse fant sted på pasientens hjemsted og ble benyttet til å følge opp konsentrasjoner av glukose samt CsA, Tac, everolimus og mykofenolat. Se Figur 2.1. og Tabell 2.1. Alle pasientene målte blodsukker hjemme under hele studien, som beskrevet mer i avsnitt 2.4.

Studien ble utført ved Nyrefysiologisk laboratorium på OUS Rikshospitalet og var uten interessekonflikter, da den ikke ble sponset av legemiddelprodusenten. Studien ble initiert av utprøver og alle utgifter ble i sin helhet betalt av Nyrefysiologisk laboratorium.



**Figur 2.1: Studiedesign.** Potensielle studiedeltakere møtte opp på OUS Rikshospitalet og utførte en OGTT. Ved blodsukker tilsvarende WHO kriterier for diabetes eller nedsatt glukosetoleranse, ble pasientene inkludert i studien. Videre undersøkelser ble utført som forklart over.



**Tabell 2.1:** Oversikt over undersøkelsesdagene og hvilke undersøkelser som ble foretatt.

	Baseline	Safety	Switch	Safety	Follow-up
Pasientoppmøte på Rikshospitalet (mat- og medikamentfastende)	X		X		X
Pasientoppmøte hos fastlege/ avtalt prøvetakingssted (mat- og medikamentfastende)		X		X	
Blodprøvetaking	X	X	X	X	X
Avlevering av urinprøve	X		X		X
Oral glukosetoleransetest (OGTT)	X		X		X
Blodtrykksmåling	X		X		X
Veiing av kroppsvekt	X		X		X
Blodprøvetaking 30 minutter og 2 timer etter start av OGTT, for analyse av blodglukose og seruminsulin	X		X		X
Nedfrysing av prøver for senere analyse av C-peptid, insulin og inflammasjonsmarkører	X		X		X
Frokost og inntak av fast morgendosering av medisiner	X		X		X
Måling av endotelfunksjon ved LDF	X		X		X
Opplæring i bruk av glykometer til hjemmemåling av blodsukker	X				
Legekonsultasjon	X		X		X
Randomisering	X				

## 2.2 Pasienter

13 nyretransplanterte pasienter med nyoppstått diabetes mellitus/nedsatt glukosetoleranse etter transplantasjon ble rekruttert i perioden august-desember 2011. Potensielle studiedeltakere ble først identifisert ved hjelp av Rikshospitalets database med resultater fra undersøkelser utført 10 uker etter transplantasjon. Identifiseringen var med hensyn på pasienter med fastende plasmaglukoseverdier  $\geq 7,0$  mmol/L, 2-timers verdier etter glukosetoleransetest  $\geq 7,8$  mmol/L eller HbA1c-verdier  $\geq 6,5$  %.

Da det ikke ble funnet nok potensielle studiedeltakere på denne måten, ble listen for pasienter som hadde hatt ettårskontroll i 2011 gjennomgått i tillegg. Dersom pasientene hadde HbA1c-verdier  $\geq 6,5$  %, ble de vurdert til å inkluderes i studien (siden HbA1c foreløpig ikke er validert for personer som gjennomgår organtransplantasjon med eller uten nyresvikt, ble pasientene først inkludert i studien dersom de hadde glukosekonsentrasjoner tilsvarende WHO kriterier for diabetes eller nedsatt glukosetoleranse etter utført OGTT).

Videre ble journalnotat og epikrise sjekket med hensyn på inklusjons- og eksklusjonskriterier, før de aktuelle pasientene ble kontaktet av overlege professor dr. med Trond Jenssen eller seksjonsoverlege professor dr. med Anders Hartmann, med forespørsel om deltagelse.

Studien var godkjent av Statens legemiddelverk og Regional etisk komité (REK). Se appendiks AIII. Pasientene mottok både muntlig og skriftlig informasjon om studien, og skriftlig samtykke til å delta i studien ble innhentet før undersøkelsene startet, i henhold til Helsinkideklarasjonen. Se appendiks AIV. Pasientene var dekket under pasientforsikringsloven. Reiseutgifter i forbindelse med undersøkelsesdagene ble dekket, ellers ble det ikke gitt noen økonomisk kompensasjon.

## **2.3 Oral glukosetoleransetest**

### **2.3.1 Metode**

Oral glukosetoleransetest (OGTT) ble utført på alle pasientene i studien for å bestemme glukosetoleranse. Verdiene i Tabell 1.1. ble benyttet som referanseverdier.

### **2.3.2 Praktisk prosedyre**

Før OGTT ble igangsatt, ble fastende blodprøver tatt fra venekateter (BD Venflon™ Pro) i albuhasen for analyse av insulin og C-peptid i serum samt blodglukose. Glukose ble målt ved å analysere ferskt fullblod på et plasmakalibrert glykometer (HemoCue glucose 201, Ängelholm, Sverige). 75 g glukose (Glucosum anhydricum ad usum parenterale, Apotekproduksjon AS) ble så rørt ut i 3 dl vann og inntatt peroralt. Det ble observert at pasientene drakk opp hele løsningen. Blodglukose ble deretter målt 30 minutter og 2 timer etter inntak av sukkerløsningen. I tillegg ble blodprøver til insulinanalyse tatt ved disse

målepunktene. Etter hver blodprøvetaking ble det injisert 1 ml heparin (Heparin LEO 100IE/ml, Leo Pharma, Ballerup, Danmark) for å hindre koagulasjon i venekateteret.

## 2.4 Hjemmemåling av blodsukker

Ved baseline fikk hver pasient utdelt et blodsukkerapparat av typen Freestyle Lite (Abbot). Det ble gitt opplæring i bruk før pasientene viste at de mestret å utføre blodsukkermåling selv. Måling av blodsukker hjemme skulle utføres fem ganger daglig under hele studien; fastende før frokost, to timer etter frokost, to timer etter lunsj, to timer etter middag samt to timer etter kveldsmat. Blodsukkerverdiene ble notert i et utdelt skjema (appendiks AV). På denne måten kunne vi se om målingene hjemme fulgte samme trend som målingene under glukosetoleransetesten på undersøkelsesdagene. Pasientene ble informert om å utføre ekstra målinger ved mistanke om hypoglykemi, som skulle noteres i et eget felt i skjemaet.

## 2.5 Mikrovaskulær endotelfunksjon

Mikrovaskulær endotelfunksjon ble undersøkt ved å stimulere endotelavhengig vasodilatasjon i arteriolene i underarmen med transdermal iontoforetisk administrasjon av acetylkolin, målt ved hjelp av Laser-Doppler flowmetri (LDF). Total mikrovaskulær endotelfunksjon ble estimert med postokklusiv reaktiv hyperemittest (PORH).

### 2.5.1 Laser-Doppler flowmetri

Mikrovaskulær endotelfunksjon kan undersøkes ved å måle blodkarenes evne til å dilatere. Vasodilatasjon kan uttrykkes som en endring i diameteren av arterier eller som en endring i blodstrømmen i mikrosirkulasjonen. Laser-Doppler flowmetri (LDF) er en ikke-invasiv metode som egner seg til å undersøke endotelavhengig vasodilatasjon ved å måle endringen i blodstrømmen i de minste resistente karene i huden, arteriolene. Prinsippet for LDF-teknikken går ut på at laserlys fra en helium-neon laser penetrerer huden og delvis reflekteres når det treffer bevegelige røde blodceller. I henhold til ”dopplerprinsippet”, vil frekvensen av det reflekterte lyset endres proporsjonalt med hastigheten til de røde blodcellene. Dette frekvensskiftet konverteres til et elektrisk signal som er proporsjonalt med volumet og hastigheten av røde blodceller som passerer det belyste området. Det elektriske signalet detekteres av en mottakende LDF-probe, og isoleres i instrumentets fotodetektor [47].

Siden det er vanskelig å vite hvilket volum som måles, kan ikke denne metoden benyttes til å måle blodstrømmen kvantitativt. Ved LDF uttrykkes blodperfusjonen som ”fluks” (volum av røde blodceller x hastighet) i arbitrære enheter (AU) [45].

### **2.5.2 Iontoforese**

Iontoforese er definert som introduksjonen av ioner av løselige salter til mikrosirkulasjonen ved hjelp av lave likestrømmer. Prinsippet for metoden er at ioner i løsning som er positivt eller negativt ladet vil migrere over intakt hud under påvirkning av tilført strøm, i henhold til loven om at like ladninger frastøter hverandre. Løsningene appliseres i et ringformet kammer med en innvendig elektrode tilkoblet iontoforeseapparatet. Den totale mengden substans som transporteres over huden er relatert til mengden og varigheten av applisert strøm (den elektriske ladningen). LDF-proben er innfelt i kammeret og registrerer forandringer i blodstrømmen [45].

### **2.5.3 Endotelavhengig vasodilatasjon**

Acetylkolin (ACh) er standard testmedikament som benyttes for å undersøke endotelfunksjon. Mekanismen for hvordan ACh medierer vasodilatasjon under iontoforese er omdiskutert, men studier har vist at vasodilatasjonen skyldes en endotelavhengig produksjon av NO og /eller prostanoider [45].

I denne studien ble den lokale effekten av ACh undersøkt ved hjelp av iontoforetisk administrasjon, kombinert med LDF-måling av blodperfusjon. ACh ble applisert i anodekammeret, og natriumklorid (NaCl) i katodekammeret. Strøm med fire forskjellige styrker ble tilført over denne kretsen, og proporsjonale mengder ACh sendes over huden og inn i arteriolene. En LDF-probe innfelt i hvert av kamrene festet til huden, måler forandringer i blodperfusjonen i arteriolene etter ACh-stimulering.

Ved iontoforetisk administrasjon av vasoaktive stoffer over huden, vil det oppstå uspesifikk vasodilatasjon, og denne effekten er kraftigst ved katoden. En 5 M NaCl-løsning ble derfor benyttet i katodekammeret, da det er vist at dette minimaliserer uspesifikk vasodilatasjon [82]. Katoden (NaCl) fungerer som en kontroll. Fraværende respons ved katoden indikerer at det ikke opptrer en uspesifikk respons ved anoden (ACh).

### **2.5.4 Postokklusiv reaktiv hyperemi (PORH)**

Postokklusiv reaktiv hyperemi (PORH) referer til den fysiologiske økningen i blodstrømmen over baselinenivå som ses etter at okklusjon av den arterielle sirkulasjonen opphører. PORH kan karakteriseres av en initial topp (peak) i fluks som oppstår i løpet av få sekunder etter opphørt okklusjon samt en forlenget hyperemi. PORH representerer en kompleks mikrovaskulær respons hvor endotelet har en potensiell rolle, men responsen er uavhengig av NO. Denne testen utføres ved å pumpe opp en blodtrykksmansjett festet på overarmen til supersystolisk trykk i en tid, for deretter å tømme mansjetten for luft [83].

I denne studien ble det benyttet en okklusjonstid på tre minutter. En LDF-probe ble festet til underarmen for å måle fluksen etter PORH. Mange parametre kan kvantifiseres fra fluksresponsen etter PORH, men i denne studien ble arealet under fluks- versus tidskurven ( $AUC_{RH}$ ) benyttet. Lokal termal hyperemi fører til en temperaturavhengig forlenget økning i blodstrømmen [83]. Det er derfor viktig at pasienten akklimatiseres og oppnår en stabil hudtemperatur før undersøkelsen igangsettes.

### **2.5.5 Praktisk prosedyre**

Undersøkelsen ble utført på formiddagen etter at glukosebelastningen var gjennomført og pasientene hadde inntatt frokost og morgendosen med medisiner. Samme dag ble 1 % ACh-løsning istandgjort ved å tilsette 10 mL deionisert vann til et 10 mL hetteglass med 100 mg frysetørket ACh (Acetylklorid, Sykehusapoteket ved Rikshospitalet). Under hele undersøkelsen lå pasientene rolig på ryggen i en seng. Underarm uten AV-fistel ble vasket forsiktig med sprit, vann og sprit igjen for å fjerne rester av såpe, krem og ioner på huden som kan interferere med undersøkelsen. Blodtrykksmansjetten ble festet rundt overarmen. To LDF-prober (DP1T/7 large area probe, Moor Instruments, England) ble festet i to (anode og katode) Perspex ionekamre med platina elektrode (ION Moor Instruments Ltd. Axminster, UK. 30 mm total diameter x 7 mm høyde; indre kammer 9,5 mm diameter x 2 mm høyde) mens huden lufttørket. Ionekamrene med laserprobene ble festet til underarmen med dobbeltsidig tape. Områder med store årer, arr og hårsekker ble unngått. Probene ble plassert slik at baseline-flux verdiene var mellom 15 og 25 arbitrære enheter (AU). ACh ble tilsatt i anodekammeret og NaCl i katodekammeret, slik at mellomrommet mellom laserprobene og huden ble fullstendig fylt med væske, og ingen luftbobler forstyrret.

Når pasientene var akklimatisert og hadde ligget i ro i omtrent 20 minutter, ble iontoforeseprogrammet (MIC 1, Moor Instruments Ltd.) startet. Effekten av ACh ble undersøkt ved tilførsel av strøm på henholdsvis 50  $\mu$ A, 75  $\mu$ A, 100  $\mu$ A og 150  $\mu$ A. Hver tilførsel av iontoforesestrøm hadde en varighet på 10 sekunder etterfulgt av monitoreringsperioder på 6 minutter. Deretter ble laserproben fra anoden flyttet til et nytt og rent kammer, som ble festet til et nytt sted på den samme underarmen. Blodtrykksmansjetten ble så pumpet opp til 280 mmHg. Trykket ble holdt i tre minutter før luften ble sluppet ut og målingen av reaktiv hyperemi startet.

## **2.6 Prøvetaking**

### **2.6.1 Blod**

Blodprøver ble tatt fra venekateteret innlagt i albuehasen. Fastende blodprøver til hematologi ble tappet på EDTA-glass for analyse av hemoglobin, trombocytter, leukocytter og HbA1c. Blodprøver for analyse av urinsyre, natrium, kalium, kalsium, fosfat, bilirubin total, ASAT, ALAT, LD, alkalisk fosfatase, GT, urea, kreatinin, albumin og CRP ble tappet på Heparin-glass tilsatt gel. Fastende blodprøver ble også tappet på EDTA-glass for å bestemme blodkonsentrasjonen av immunsuppressiva (CsA, Tac, everolimus, mykofenolat). Disse prøvene ble analysert ved Avdeling for medisinsk biokjemi, OUS Rikshospitalet.

### **2.6.2 Urin**

Pasientene ble bedt om å ta med morgenurin på undersøkelsesdagene. Urinprøvene ble analysert på Klinisk Kjemisk Avdeling på OUS Rikshospitalet, hvor de ble testet med stix for glukose, ketoner, pH, protein, blod, nitritt og leukocytter. Totalprotein og kreatinin ble også målt.

### **2.6.3 Blodtrykk**

Blodtrykket ble målt sittende etter ca. 10 minutters hvile. Det ble utført tre målinger ved hjelp av Dyna Map (Tuff.-Cuff, CAS Medical system Inc.). Gjennomsnittet av de to siste målingene ble benyttet.

## 2.7 Analyser av biokjemiske markører

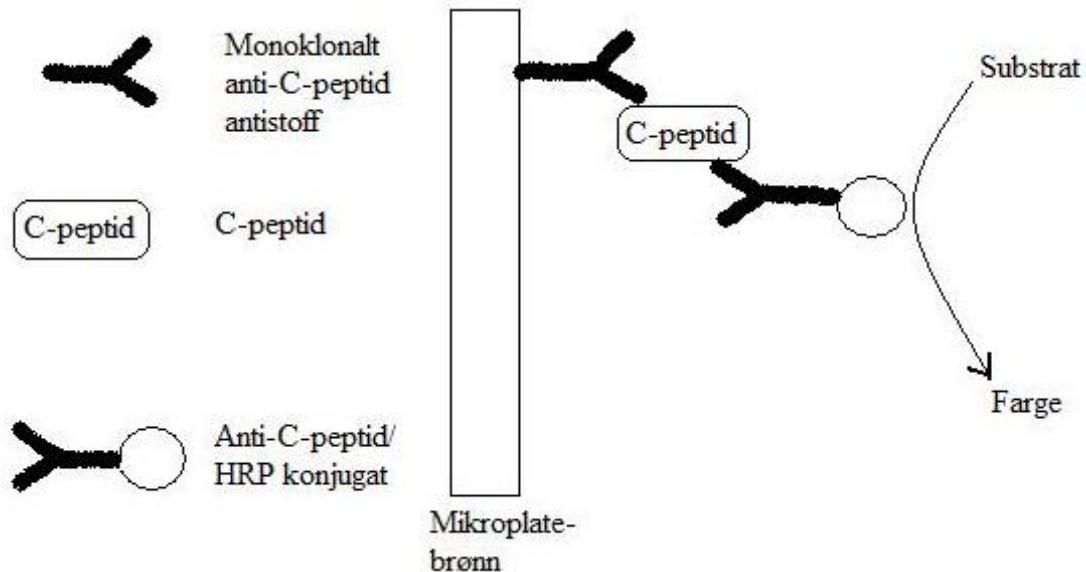
Blodprøver for analyse av C-peptid og insulin ble tappet på serum-glass tilsatt gel før de ble satt til å koagulere ved romtemperatur i ca. 15 minutter. Fastende prøver til analyse av inflammasjonsmarkører i plasma ble tappet på EDTA-glass. Alle vakuumglassene ble så sentrifugert ved 1800 RCF i 10 minutter. Serum og plasma ble deretter avpipettert med pasteurpipette og fordelt på to cryo-rør (Nunc CryoTubes™). Disse ble lagret i fryser som holdt -70 °C frem til de skulle analyseres.

### 2.7.1 ELISA-kit

C-peptid, insulin og valgte inflammasjonsmarkører ble analysert ved å benytte kommersielt tilgjengelige ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-kit. I denne studien ble det bestilt ELISA-kit fra tre forskjellige firma; Dako (Glostrup, Danmark) for analyse av C-peptid, Invitrogen Ltd (Paisley, UK) for analyse av insulin og Abcam plc (Cambridge, UK) for analyse av diverse inflammasjonsmarkører i plasma. ELISA-testene ble utført i henhold til fabrikantenes spesifikasjoner.

#### *Bakgrunn for analyse av C-peptid og insulin*

C-peptid/insulin i serumprøvene og enzymmerket C-peptid/insulin konkurrerer om binding til et spesifikt anti-C-peptid/insulin antistoff som er coatet i en mikroplate med 96 brønner. Et kompleks dannes under samtidig inkubering. Ubundne komponenter fjernes deretter med vaskebuffer. I det siste analysetrinnet reagerer enzymdelen av komplekset med et substrat. Bundet konjugat detekteres ved at det genereres en blåfarge i brønnene. Reaksjonen stoppes ved å tilsette syre, og fargen i brønnene endres fra blå til gul. Mikroplaten avleses så spektrofometrisk. Intensiteten på fargen i brønnene vil være direkte proporsjonal med konsentrasjonen av C-peptid/insulin i prøvene (se Figur 2.2).



**Figur 2.2: Prinsipp for analyse med ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)-kit.**

*ELISA er en immunologisk metode som baserer seg på to monoklonale antistoff. Figuren viser prinsippet bak metoden, med C-peptid som eksempel (modifisert fra spesifikasjonen til Dako).*

### **Bakgrunn for analyse av de forskjellige inflammasjonsmarkørene**

ELISA-kitene fra Abcam plc baserer seg på samme prinsipp som ELISA-kitene fra Dako og Invitrogen Ltd, men prosedyrene består av flere inkuberings- og vasketrinn samt mer omfattende tilberedning av reagenser. Abcam plc ELISA-kit måler kvantitative mengder av inflammasjonsmarkører i plasma. Metoden benytter et antistoff spesifikt for den inflammasjonsmarkøren som ønskes analysert som er coatet på en mikroplate med 96 brønner. Standarder, prøver og eventuelle kontroller pipetteres i brønnene og inflammasjonsmarkør til stede i en prøve bindes til brønnene av antistoffet. Brønnene vaskes med vaskebuffer og biotinylert anti- antistoff for ønsket inflammasjonsmarkør tilsettes. Etter å ha vasket bort ubundet biotinylert antistoff, pipetteres HRP (Horse-Radish peroxidase)-konjugert streptavidin i brønnene. Brønnene vaskes igjen før et substrat tilsettes i brønnene. En blåfarge utvikles i samsvar med mengde inflammasjonsmarkør som er bundet. Reaksjonen stoppes ved å tilsette syre, som endrer fargen i brønnene fra blå til gul. Mikroplaten avleses så spektrofometrisk. Intensiteten på fargen i brønnene vil være direkte proporsjonal med konsentrasjonen av inflammasjonsmarkør i prøvene.



### ***Beregninger***

En plateleser (Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland) leste av prøvenes optiske tetthet (OD) ved bølgelengde 450 nm. Alle ELISA-kitene hadde standarder med kjent konsentrasjon av de respektive markørene. Disse ble benyttet til å lage en standardrekke. De avleste OD-verdiene for standardrekken ble benyttet til å lage en standardkurve (x-akse: standardkonsentrasjon, y-akse: absorbans) ved hjelp av et dataprogram (Wallac 1420 Manager, Software version 3.0, Perkin Elmer, Turku, Finland). Det ble benyttet fire parameters kurvetilpasning for å tegne best tilpasset linje gjennom standardpunktene. Konsentrasjonen av de respektive markørene i pasientprøvene ble bestemt ved å sammenligne absorbans i disse brønnene mot standardkurven. Alle standarder, pasientprøver og eventuelle kontroller ble pipetert i duplikat slik at gjennomsnittlig konsentrasjon ble beregnet ut fra gjennomsnittlig absorbans.

#### **2.7.2 Analyse av C-peptid**

Konsentrasjonene av C-peptid i pasientprøvene ble bestemt ved å benytte et C-peptid ELISA kit (Dako, K6220, Glostrup, Danmark).

Konsentrasjonen av C-peptid i kalibratorene var oppgitt i både ng/mL og i SI-enheten pmol/L:

<b>Kalibrator</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
ng/mL	0	0,3	3	9	15
pmol/L	0	100	1000	3000	5000

### ***Praktisk prosedyre***

25 µL av kalibratorene og pasientprøvene ble pipetert i duplikat i sine respektive brønner. Deretter ble 100 µL konjugat (anti-C-peptid-HRP) tilsatt i hver brønn før mikroplaten ble ristet under inkubering ved romtemperatur i 60 minutter. Brønnene i mikroplaten ble så vasket manuelt i tre omganger med 250 µL fortynnet vaskebuffer (15x). Bundet konjugat ble detektert ved å tilsette 100 µL substrat (3,3'-5,5'-tetrametylbenzidin; TMB) i hver brønn. Mikroplaten ble igjen ristet ved romtemperatur, denne gangen i 10 minutter. Reaksjonen mellom substratet og bundet konjugat ble stoppet ved å tilsette 100 µL stopp-løsning (0,46 mol/L svovelsyre) i hver brønn. Se Tabell 2.2. En plateleser (Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland) leste av prøvenes optiske tetthet (OD) ved bølgelengde 450 nm.

**Tabell 2.2:** Analyse av C-peptid. Oversikt over pipettering av reagenser i de respektive brønnene i mikroplaten, volum  $\mu\text{L}$ .

	Standardrekke	Pasientprøve
Kalibrator (standard)	25	
Pasientprøve (0-prøve)		25
Konjugat	100	100
Vaskebuffer	3 x 250	3 x 250
Substrat	100	100
Stopp-løsning	100	100

### Validering

Denne analysen hadde en gjennomsnittlig variasjonskoeffisient for ”intra assay” presisjon på 3,3 % i henhold til leverandøren. Gjennomsnittlig variasjonskoeffisient for ”inter assay” presisjon var 3,1 %. Det vil si at metoden gir liten variasjon innad i analysene og mellom hver analyse. Gjennomsnittlig ”recovery” var i kitets spesifikasjon angitt til 98,2 %.

### 2.7.3 Analyse av insulin

Blodprøver til analyse av insulin ble tatt fastende samt 30 minutter og 2 timer etter peroralt inntak av glukoseløsning (OGTT) som beskrevet i avsnitt 2.3.2. Konsentrasjonene av insulin i pasientprøvene ble bestemt ved å benytte et ELISA kit for humant insulin (Human Insulin, Invitrogen Ltd, KAK1251, Paisley, UK). Denne analysen benytter monoklonale antistoffer som er spesifikke mot bestemte epitoper av insulin.

I dette kitet var konsentrasjonen av insulin i standardene oppgitt i  $\mu\text{IU/mL}$ :

Standard	0	1	2	3	4	5
$\mu\text{IU/mL}$	0	4,9	14,5	48	138	259

### Praktisk prosedyre

Før igangsetting ble det satt av et duplikat til blank-prøve hvor det kun skulle tilsettes substrat og stopp-løsning. 50  $\mu\text{L}$  av hver standard, kontroll og pasientprøve ble pipettert i duplikat i sine respektive brønner. Deretter ble 50  $\mu\text{L}$  konjugat (Anti-Insulin-HRP) tilsatt i hver brønn før mikroplaten ble ristet under inkubering ved romtemperatur i 30 minutter. Brønnene i mikroplaten ble så vasket manuelt i tre omganger med 400  $\mu\text{L}$  fortynnet vaskebuffer (200x). Bundet konjugat ble detektert ved å tilsette 100  $\mu\text{L}$  kromogen substrat (3,3'-5,5'-

tetrametylbenzidin; TMB) i hver brønn. Mikroplaten ble igjen ristet ved romtemperatur, denne gangen i 15 minutter beskyttet mot lys. Reaksjonen mellom substratet og bundet konjugat ble stoppet ved å tilsette 100 µL stopp-løsning (1.0 N HCl) i hver brønn. Se Tabell 2.3. En plateleser (Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland) leste av prøvenes optiske tetthet (OD) ved bølgelengde 450 nm.

**Tabell 2.3:** Analyse av insulin. Oversikt over pipettering av reagenser i de respektive brønnene i mikroplaten, volum µL.

	Blank	Standardrekke	Kontroller	Prøve
Standard		50		
Kontroller			50	
Pasientprøve				50
Konjugat		50	50	50
Vaskebuffer	3 X 400	3 X 400	3 X 400	3 x 400
Substrat	100	100	100	100
Stopp-løsning	100	100	100	100

### Validering

Denne analysen hadde en gjennomsnittlig variasjonskoeffisient for ”intra assay” presisjon på 5,4 % i henhold til leverandøren. Gjennomsnittlig variasjonskoeffisient for ”inter assay” presisjon var 8,6 %. Det vil si at metoden gir relativt liten variasjon innad i analysene, men litt større variasjon mellom hver analyse. Gjennomsnittlig ”recovery” var i kitets spesifikasjon angitt til 93,1 %.

## 2.7.4 Analyse av mikro-CRP

Konsentrasjonene av mikro-CRP i pasientprøvene ble bestemt ved å benytte et ELISA kit for humant C Reactive Protein (Abcam plc, ab108826, Cambridge, UK).

### Praktisk prosedyre

Pasientprøvene ble først fortynnet 1:1000 med kitets fortynningsmiddel. En standardløsning på 16 ng/mL ble klargjort ved å løse opp kitets frysetørkede humane CRP standard. Denne løsningen ble så seriefortynnet tofoldig for å produsere standarder på 8, 4, 2, 1, 0,5 og 0,25 ng/mL. Fortynningsmiddelet ble benyttet som nullstandard. 50 µL av hver standard og pasientprøve ble pipettert i duplikat i sine respektive brønner før mikroplaten ble forseglet

med kitets tape og inkubert ved romtemperatur i to timer. Brønnene i mikroplaten ble så vasket manuelt i fem omganger med 200 µL fortynnet vaskebuffer (20x). Deretter ble 50 µL biotinyler CRP antistoff tilsatt i hver brønn før mikroplaten igjen ble forseglet og inkubert ved romtemperatur, denne gangen i 30 minutter. Brønnene i mikroplaten ble vasket som forklart over, før 50 µL konjugat (Streptavidin-Peroxidase) ble tilsatt i hver brønn. Mikroplaten ble igjen inkubert ved romtemperatur i 30 minutter før ny manuell vasking. Bundet konjugat ble detektert ved å tilsette 50 µL kromogen substrat (3,3'-5,5'-tetrametylbenzidin; TMB) i hver brønn. Mikroplaten ble inkubert i ca. 10 minutter til optimal blåfarge utviklet seg i brønnene. Reaksjonen mellom substratet og bundet konjugat ble stoppet ved å tilsette 50 µL stopp-løsning (0,5 N HCl) i hver brønn. Se Tabell 2.4. En plateleser (Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland) leste av prøvenes optiske tetthet (OD) ved bølgelengde 450 nm.

**Tabell 2.4:** *Analyse av mikro-CRP. Oversikt over pipettering av reagenser i de respektive brønnene i mikroplaten, volum µL.*

	Standardrekke	Pasientprøve
Standard	50	
Pasientprøve		50
Vaskebuffer	5 x 200	5 x 200
Antistoff	50	50
Vaskebuffer	5 x 200	5 x 200
Konjugat	50	50
Vaskebuffer	5 x 200	5 x 200
Substrat	50	50
Stopp-løsning	50	50

### **Validering**

Denne analysen hadde variasjonskoeffisient for "intra assay" presisjon på 5,4 % i henhold til leverandøren. Variasjonskoeffisient for "inter assay" presisjon var 7,7 %. Det vil si at metoden gir relativt liten variasjon innad i analysene og litt større variasjon mellom hver analyse. Gjennomsnittlig "recovery" var i kitets spesifikasjon angitt til 99 %.

### **2.7.5 Analyse av VCAM-1 ("vascular cell adhesion molecule-1")**

Konsentrasjonene av VCAM-1 i pasientprøvene ble bestemt ved å benytte et ELISA kit for humant VCAM-1 (Abcam plc, ab100661, Cambridge, UK).

#### ***Praktisk prosedyre***

Pasientprøvene ble først fortynnet 1:5 med kitets fortynningsmiddel. En standardløsning på 60 ng/mL ble klargjort ved å tilsette 600 µL fortynningsmiddel til kitets frysetørkede humane standard av rekombinant VCAM-1. 300 µL av denne løsningen ble pipettert i et eppendorfrør med 200 µL fortynningsmiddel for å lage en grunnstandard på 60 ng/mL. Grunnstandarden ble så seriefortynnet trefoldig for å produsere standarder på 60, 20, 6,667, 2,222, 0,741 og 0,247 ng/mL. Fortynningsmiddelet ble benyttet som nullstandard. 100 µL av hver standard og pasientprøve ble pipettert i duplikat i sine respektive brønner før mikroplaten ble forseglet med kitets tape og inkubert under risting ved romtemperatur i 2,5 timer. Brønnene i mikroplaten ble så vasket manuelt i fire omganger med 300 µL fortynnet vaskebuffer (20x). Deretter ble 100 µL biotinyllert humant anti-VCAM1 antistoff tilsatt i hver brønn før mikroplaten igjen ble forseglet og inkubert under risting ved romtemperatur, denne gangen i en time. Brønnene i mikroplaten ble vasket som forklart over, før 100 µL konjugat (HRP-Streptavidin) ble tilsatt i hver brønn. Mikroplaten ble igjen inkubert under risting ved romtemperatur i 45 minutter før ny manuell vasking. Bundet konjugat ble detektert ved å tilsette 100 µL substrat (3,3'-5,5'-tetrametylbenzidin; TMB) i hver brønn. Mikroplaten ble så inkubert under risting i et mørkt rom i 30 minutter. Reaksjonen mellom substratet og bundet konjugat ble stoppet ved å tilsette 50 µL stopp-løsning (0,2 M svovelsyre) i hver brønn. Se Tabell 2.5. En plateleser (Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland) leste av prøvenes optiske tetthet (OD) ved bølgelengde 450 nm.

**Tabell 2.5:** Analyse av VCAM-1. Oversikt over pipettering av reagenser i de respektive brønnene i mikroplaten, volum  $\mu\text{L}$ .

	Standardrekke	Pasientprøve
Standard	100	
Pasientprøve		100
Vaskebuffer	4 x 300	4 x 300
Antistoff	100	100
Vaskebuffer	4 x 300	4 x 300
Konjugat	100	100
Vaskebuffer	4 x 300	4 x 300
Substrat	100	100
Stopp-løsning	50	50

### Validering

Denne analysen hadde variasjonskoeffisient for ”intra assay” presisjon på  $< 10\%$  i henhold til leverandøren. Variasjonskoeffisient for ”inter assay” presisjon var  $< 12\%$ . Gjennomsnittlig ”recovery” var i kitets spesifikasjon angitt til  $93,6\%$  for plasma.

### 2.7.6 Analyse av sTNFR-1 (”soluble tumor necrosis factor receptor-1”)

Konsentrasjonene av sTNFR-1 i pasientprøvene ble bestemt ved å benytte et ELISA kit for humant sTNFR-1 (Abcam plc, ab100642, Cambridge, UK).

### Praktisk prosedyre

Pasientprøvene ble først fortynnet 1:3 med kitets fortynningsmiddel. En standardløsning på  $10\text{ ng/mL}$  ble klargjort ved å tilsette  $400\text{ }\mu\text{L}$  fortynningsmiddel til kitets frysetørkede humane standard av rekombinant sTNFR-1.  $40\text{ }\mu\text{L}$  av denne løsningen ble pipettert i et eppendorfrør med  $960\text{ }\mu\text{L}$  fortynningsmiddel for å lage en grunnstandard på  $400\text{ pg/mL}$ . Grunnstandarden ble så seriefortynnet trefoldig for å lage en standardrekke med konsentrasjoner på  $400, 133,3, 44,44, 14,81, 4,94, 1,65$  og  $0,55\text{ pg/mL}$ . Fortynningsmiddelet ble benyttet som nullstandard.  $100\text{ }\mu\text{L}$  av hver standard og pasientprøve ble pipettert i duplikat i sine respektive brønner før mikroplaten ble forseglet med kitets tape og inkubert under risting ved romtemperatur i  $2,5$  timer. Brønnene i mikroplaten ble så vasket manuelt i fire omganger med  $300\text{ }\mu\text{L}$  fortynnet vaskebuffer (20x). Deretter ble  $100\text{ }\mu\text{L}$  biotinylert sTNFR-1 antistoff tilsatt i hver brønn før

mikroplaten igjen ble forseglet og inkubert under risting ved romtemperatur, denne gangen i en time. Brønnene i mikroplaten ble vasket som forklart over, før 100 µL konjugat (HRP-Streptavidin) ble tilsatt i hver brønn. Mikroplaten ble igjen inkubert under risting ved romtemperatur i 45 minutter før ny manuell vasking. Bundet konjugat ble detektert ved å tilsette 100 µL substrat (3,3'-5,5'-tetrametylbenzidin; TMB) i hver brønn. Mikroplaten ble så inkubert under risting i et mørkt rom i 30 minutter. Reaksjonen mellom substratet og bundet konjugat ble stoppet ved å tilsette 50 µL stopp-løsning (2 M svovelsyre) i hver brønn. Se Tabell 2.6. En plateleser (Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland) leste av prøvenes optiske tetthet (OD) ved bølgelengde 450 nm.

**Tabell 2.6:** Analyse av *sTNFR-1*. Oversikt over pipettering av reagenser i de respektive brønnene i mikroplaten, volum µL.

	Standardrekke	Pasientprøve
Standard	100	
Pasientprøve		100
Vaskebuffer	4 x 300	4 x 300
Antistoff	100	100
Vaskebuffer	4 x 300	4 x 300
Konjugat	100	100
Vaskebuffer	4 x 300	4 x 300
Substrat	100	100
Stopp-løsning	50	50

### **Validering**

Denne analysen hadde variasjonskoeffisient for ”intra assay” presisjon på < 10 % i henhold til leverandøren. Variasjonskoeffisient for ”inter assay” presisjon var < 12 %. Gjennomsnittlig ”recovery” var i kitets spesifikasjon angitt til 81,4 % for plasma.

### 2.7.7 Analyse av adiponectin

Konsentrasjonene av adiponectin i pasientprøvene ble bestemt ved å benytte et ELISA kit for humant adiponectin (Abcam plc, ab99968, Cambridge, UK).

#### *Praktisk prosedyre*

Pasientprøvene ble først fortynnet 1:30 000 med kitets fortynningsmiddel (0,09 % natriumazid som konserveringsmiddel). En standardløsning på 50 ng/mL ble klargjort ved å tilsette 800 µL fortynningsmiddel til kitets frysetørkede humane adiponectin standard. 180 µL av denne løsningen ble pipettert i et eppendorfrør med 320 µL fortynningsmiddel for å lage en grunnstandard på 18 000 pg/mL. Grunnstandarden ble så seriefortynnet trefoldig for å lage en standardrekke med konsentrasjoner på 18 000, 6 000, 2 000, 666,7, 222,2, 74,07 og 24,69 pg/mL. Fortynningsmiddelet ble benyttet som nullstandard. 100 µL av hver standard og pasientprøve ble pipettert i duplikat i sine respektive brønner før mikroplaten ble forseglet med kitets tape og inkubert under risting ved romtemperatur i 2,5 timer. Brønnene i mikroplaten ble så vasket manuelt i fire omganger med 300 µL fortynnet vaskebuffer (20x). Deretter ble 100 µL biotinyllert adiponectin antistoff tilsatt i hver brønn før mikroplaten igjen ble forseglet og inkubert under risting ved romtemperatur, denne gangen i en time. Brønnene i mikroplaten ble vasket som forklart over, før 100 µL konjugat (HRP-Streptavidin) ble tilsatt i hver brønn. Mikroplaten ble igjen inkubert under risting ved romtemperatur i 45 minutter før ny manuell vasking. Bundet konjugat ble detektert ved å tilsette 100 µL substrat (3,3'-5,5'-tetrametylbenzidin; TMB) i hver brønn. Mikroplaten ble så inkubert under risting i et mørkt rom i 30 minutter. Reaksjonen mellom substratet og bundet konjugat ble stoppet ved å tilsette 50 µL stopp-løsning (2 M svovelsyre) i hver brønn. Se Tabell 2.7. En plateleser (Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland) leste av prøvenes optiske tetthet (OD) ved bølgelengde 450 nm.



**Tabell 2.7:** Analyse av adiponectin. Oversikt over pipettering av reagenser i de respektive brønnene i mikroplaten, volum  $\mu\text{L}$ .

	Standardrekke	Pasientprøve
Standard	100	
Pasientprøve		100
Vaskebuffer	4 x 300	4 x 300
Antistoff	100	100
Vaskebuffer	4 x 300	4 x 300
Konjugat	100	100
Vaskebuffer	4 x 300	4 x 300
Substrat	100	100
Stopp-løsning	50	50

### Validering

Denne analysen hadde variasjonskoeffisient for ”intra assay” presisjon på  $< 10\%$  i henhold til leverandøren. Variasjonskoeffisient for ”inter assay” presisjon var  $< 12\%$ . Gjennomsnittlig ”recovery” var i kitets spesifikasjon angitt til  $90,3\%$  for plasma.

## 2.7.8 Analyse av interleukin-10

Konsentrasjonene av interleukin (IL)-10 i pasientprøvene ble bestemt ved å benytte et ELISA kit for (Abcam plc, ab46057, Cambridge, UK).

### Praktisk prosedyre

En standardløsning på  $400\text{ pg/mL}$  ble klargjort ved å tilsette  $900\text{ }\mu\text{L}$  fortynningsmiddel til kitets konsentrerte humane IL-10 standard. Denne løsningen ble så seriefortynnet tofoldig for å produsere standarder med konsentrasjoner på  $400$ ,  $200$ ,  $100$ ,  $50$ ,  $25$  og  $12,5\text{ pg/mL}$ . Fortynningsmiddelet ble benyttet som nullstandard.  $100\text{ }\mu\text{L}$  av hver standard, pasientprøve og kontroll ( $240\pm 62\text{ pg/mL}$ ) ble pipettert i duplikat i sine respektive brønner.  $50\text{ }\mu\text{L}$  biotinyllert anti-IL-10 antistoff ble tilsatt i hver brønn før mikroplaten ble forseglest med kitets tape og inkubert ved romtemperatur i to timer. Brønnene i mikroplaten ble så vasket manuelt i tre omganger med  $300\text{ }\mu\text{L}$  fortynnet vaskebuffer ( $200\times$ ). Deretter ble  $100\text{ }\mu\text{L}$  konjugat (HRP-Streptavidin) ble tilsatt i hver brønn. Mikroplaten ble igjen forseglest og inkubert ved romtemperatur i 30 minutter før ny manuell vasking. Bundet konjugat ble detektert ved å

tilsette 100 µL substrat (3,3'-5,5'-tetrametylbenzidin; TMB) i hver brønn. Mikroplaten ble så inkubert ved romtemperatur og beskyttet mot lys i 12-15 minutter. Reaksjonen mellom substratet og bundet konjugat ble stoppet ved å tilsette 100 µL stopp-løsning (9,8 % svovelsyre) i hver brønn. Se Tabell 2.8. En plateleser (Wallac VICTOR3™, 1420 multilabel counter, Perkin Elmer, Turku, Finland) leste av prøvenes optiske tetthet (OD) ved bølglengde 450 nm.

**Tabell 2.8:** Analyse av IL-10. Oversikt over pipettering av reagenser i de respektive brønnene i mikroplaten, volum µL.

	Standardrekke	Kontroll	Pasientprøve
Standard	100		
Kontroll		100	
Pasientprøve			100
Antistoff	50	50	50
Vaskebuffer	3 x 300	3 x 300	3 x 300
Konjugat	100	100	100
Vaskebuffer	3 x 300	3 x 300	3 x 300
Substrat	100	100	100
Stopp-løsning	100	100	100

### **Validering**

Denne analysen hadde variasjonskoeffisient for "intra assay" presisjon på 3,2 % i henhold til leverandøren. Variasjonskoeffisient for "inter assay" presisjon var 7,3 %. Gjennomsnittlig "recovery" var i kitets spesifikasjon angitt til 98 %. Minste detekterbare dose IL-10 var angitt til å være < 5 pg/mL.

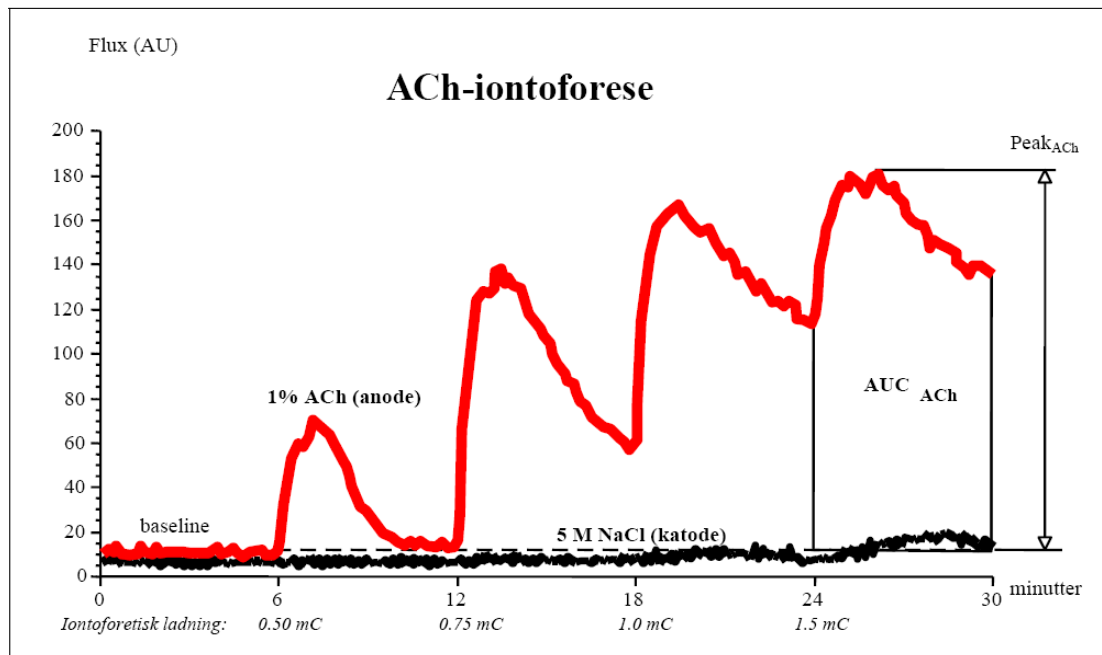
## 2.8 Beregninger

### 2.8.1 Mikrovaskulær endotelfunksjon

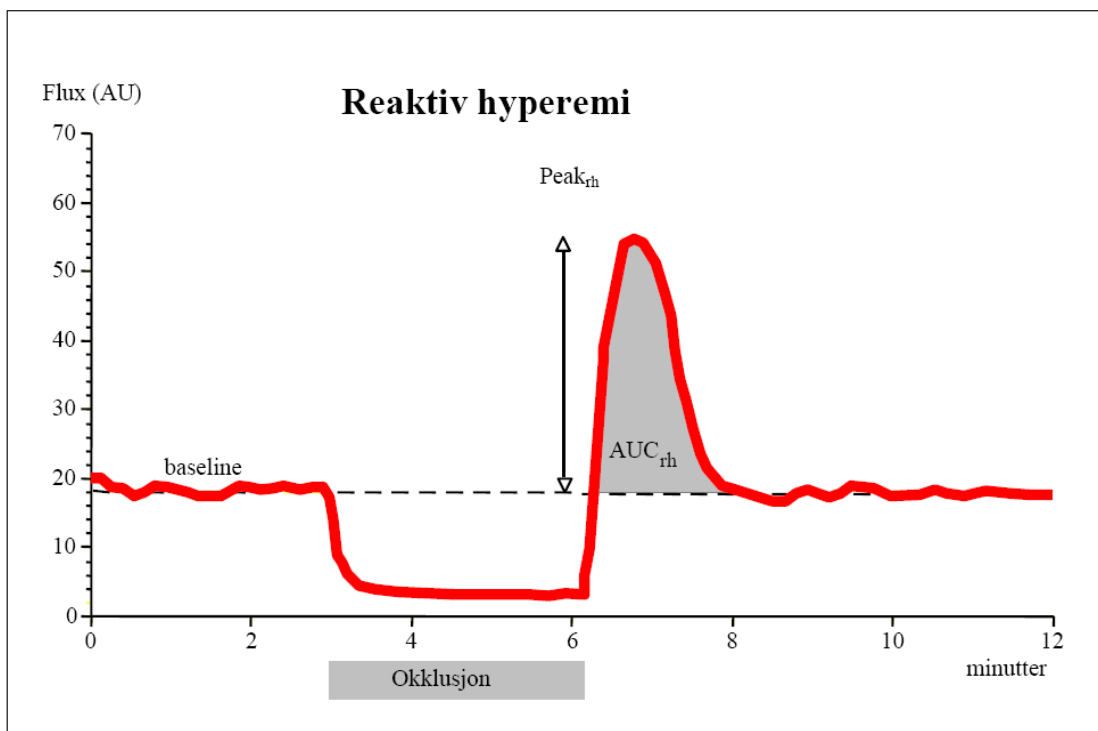
Endringer i fluks ble målt med DRT4 (Laser Doppler Perfusion and Temperature Monitor, DRT4, MOOR Instruments Ltd., England) og analysert ved hjelp av MoorSOFT software package (Laser Doppler Perfusion Monitor, 2.0, Moor Instruments Ltd., UK). Baselineverdien ble beregnet som gjennomsnittlig fluks over tre minutter før start av iontoforeseprotokollen. Responsen på ACh-stimulering ble beregnet som arealet under fluks- versus tidskurven,  $AUC_{ACh}$ , (minus areal under baseline) i den seks minutters lange monitoreringsperioden etter stimulering med 150  $\mu A$  (se Figur 2.3).

$AUC_{ACh}$  ble avlest direkte fra statistikkfunksjonen i MoorSOFT. Arealet under kurven på kontrollmålingen ( $AUC_{katode}$ ) beskriver uspesifikk vasodilatasjon, og dersom denne var høyere enn 200 AU x min, ble målingene ekskludert. Ved høyt utslag for  $AUC_{katode}$  under ACh-stimulering, kan en ikke si om målingen skyldes ACh eller andre faktorer. Dette eksklusjonskriteriet ble definert på forhånd ut fra tidligere erfaringer.

Ved PORH ble baselineverdien beregnet som gjennomsnittlig fluks over tre minutter før okklusjon. Arealet under fluks- versus tidskurven for den totale reaktive hyperemi-fasen ( $AUC_{Rh}$ ) ble også avlest direkte fra statistikkfunksjonen i MoorSOFT (se Figur 2.4).



**Figur 2.3:** Kurve (fluks versus tid) for iontopforese av ACh (anode) og NaCl (katode) [84]. Parameteren  $AUC_{ACh}$  (AU x min), beregnet etter stimulering med  $150 \mu A$  i 10 sek (1,5 mC), er markert på figuren.



**Figur 2.4:** Kurve (fluks versus tid) for postokklusiv reaktiv hyperemi [84]. Parameteren  $AUC_{Rh}$  (AU x min), beregnet etter okklusjon i tre minutter, er markert på figuren.

### 2.8.2 C-peptid til glukose, kreatinin ratio

Måling av C-peptid er en egnet metode for å undersøke  $\beta$ -cellefunksjon, da C-peptid utskilles i den systemiske sirkulasjonen i et nært forhold til insulin, i tillegg til at det viser en høy analysemessig reproducerbarhet. Men måling av C-peptid kan gi misvisende resultater, fordi konsentrasjonen av C-peptid i plasma kan bli veldig høy dersom glukosekonsentrasjonen er høy. Ved å kalkulere C-peptid til glukose ratio, korrigeres det for høye glukosekonsentrasjoner. Siden C-peptid elimineres via nyrene, er det ofte nødvendig å korrigere for nyrefunksjon i tillegg. Dette gjøres ved å kalkulere C-peptid til glukose, kreatinin ratio (CPGCR) [85].

C-peptid var oppgitt i ng/mL og ble regnet om til SI-enheten nmol/L ved å benytte konverteringsfaktoren  $1 \text{ ng/mL} = 0,333 \text{ nmol/L}$  [86]. CPGCR ble kalkulert ved å benytte følgende formel:

$$\text{CPGCR} = (C\text{-peptid (nmol/L)} \times 100) / (glukose (mmol/L) \times kreatinin (\mu\text{mol/L})).$$

Prøvene ble tatt fastende og til samme tid for alle tre parameterne som inngår i formelen.

### 2.8.3 Insulinsekresjon

Glukose- og insulinkonsentrasjon fra OGTT ble benyttet for å estimere førstefase (Skr1.fase) - og andrefase (Skr2.fase) -insulinsekresjon. Insulin var oppgitt i  $\mu\text{IU/mL}$  og ble regnet om til SI-enheten pmol/L ved å benytte konverteringsfaktoren  $1 \mu\text{IU/mL} = 6,945 \text{ pmol/L}$  [86]. Beregningene ble utført ved hjelp av Stumvoll's algoritme [87]:

$$\text{Skr1.fase} = 1283 + 1,829 \times \text{Ins}_{30} (\text{pmol/L}) - 138,7 \times \text{Gluc}_{30} (\text{mmol/L}) + 3,772 \times \text{Ins}_0 (\text{pmol/L})$$

$$\text{Skr2.fase} = 287 + 0,4164 \times \text{Ins}_{30} (\text{pmol/L}) - 26,07 \times \text{Gluc}_{30} (\text{mmol/L}) + 0,9226 \times \text{Ins}_0 (\text{pmol/L})$$

### 2.8.4 Insulinsensitivitet

BMI som demografisk parameter samt glukose- og insulinkonsentrasjon fra OGTT ble benyttet for å beregne insulinsensitivitet. Formelen for insulinsensitivitetsindeks (ISI) som er modifisert for å passe nyretransplanterte (tx) pasienter, ble benyttet [88]:

$$\text{ISI}_{\text{TX}} = 0,208 - 0,0032 \times \text{BMI} (\text{kg/m}^2) - 0,0000645 \times \text{Ins}_{120} (\text{pmol/L}) - 0,00375 \times \text{Gluc}_{120} (\text{mmol/L})$$

### 2.8.5 Glomerulær filtrasjonsrate

Sitagliptindosen ble som nevnt justert i forhold til individuell nyrefunksjon målt på bakgrunn av estimert kreatinin clearance (mL/min), som gir et mål på glomerulær filtrasjonsrate (GFR). GFR (mL/min) ble beregnet ved hjelp av Cockcroft-Gault-ligningen [89]:

$$GFR \text{ (mL/min)} = (140 - \text{alder (år)}) \times \text{vekt (kg)} / 72 \times \text{serumkreatinin (mg/dl)}$$

*Dersom kvinne:  $\times 0,85$ .*

## 2.9 Adherence

Adherence-problemer er ikke forventet i denne pasientpopulasjonen. Ved utlevering av studiemedikament, ble pasientene allikevel informert om ikke å kaste tabletter som ble til overs eller eventuelle gjenglemte tabletter. Etter endt periode med sitagliptinbehandling ble esken med blisterpakninger levert inn, og adherence ble sikret ved tablettelling.

## 2.10 Statistikk

Den primære effektvariabelen i studien var gjennomsnittlig differanse i insulinsekresjon etter endt kontrollperiode og etter perioden med sitagliptinbehandling målt mot baseline.

Følgende nullhypotese:

$H_0$ : Det er ingen forskjell i effekt mellom sitagliptinbehandling og kontroll,  $\mu_1 = \mu_2$   
ble testet mot det tosidige alternativet

$H_A$ : Det er forskjell i effekt mellom sitagliptinbehandling og kontroll,  $\mu_1 \neq \mu_2$ .

### 2.10.1 Antall pasienter

Det er tidligere utført en pilotstudie hvor 12 pasienter fullførte [90], men det forelå validerbare data for kun seks av disse pasientene til å beregne insulinsekresjon ved alle tre undersøkelsesdagene. Det var derfor behov for å inkludere flere pasienter for å få nok evaluerbare pasienter i henhold til prøvestørrelsen kalkulert i protokollen. Standardavviket for beregningen av antall pasienter ble basert på antagelsen om at sitagliptin induserer en 25 %  $\pm 20$  % større endring i insulinsekresjon i løpet av de fire ukene med sitagliptinbehandling sammenlignet med kontrollperioden.

Antallet pasienter som måtte inkluderes i studien ble beregnet ved hjelp av følgende formel;

$$n = 2 * (s/\Delta)^2 * k$$

- s; standardavvik
- $\Delta$ ; differansen mellom gjennomsnittene
- k; konstant som avhenger av valgt teststyrke og grense for p-verdi, her k= 7,9.

Totalt 25 pasienter ble inkludert i studien for å sikre en teststyrke på 80 % med et signifikansnivå på 5 %.

### **2.10.2 Statistisk analysemetode**

Alle parametre ble analysert som gjennomsnittlig differanse ved slutten av de to behandlingsperiodene målt mot baseline, og differansene ble sammenlignet. Resultatene inkluderer alle 25 pasientene, og er oppgitt som gjennomsnitt  $\pm$  standardavvik dersom ikke annet oppgis.

P-verdi for differansene ble beregnet ved hjelp av parret to-utvalgs t-test for normalfordelte data, og p-verdier  $<0,05$  ble ansett som statistisk signifikante. Behandlingseffektens størrelse ble estimert ved hjelp av et 95 % konfidensintervall (KI), som gir et uttrykk for usikkerheten i estimatet av behandlingseffekten [91]. De sekundære effektvariablene ble også analysert ved hjelp av parret to-utvalgs t-test.

De statistiske beregningene ble utført ved hjelp av programvaren GraphPad Prism 5.

## 3 Resultater

### 3.1 Pasienter

Totalt 25 pasienter har fullført studien, hvorav 16 menn og ni kvinner (12 pasienter fra Karen Vik sin masteroppgave [90]). Ved inklusjon var gjennomsnittsalderen  $63,6 \pm 10,9$  år og gjennomsnittlig tid siden transplantasjon var  $3,5 \pm 5,3$  år. Syv av pasientene hadde fått nyre fra en levende donor og fire av disse ble transplantert preemptivt. Ti pasienter hadde ingen HLA DR mismatch, mens 14 pasienter hadde 1 mismatch. HLA DR mismatch er ukjent for en pasient grunnet manglende tilgang på data, da pasienten er transplantert for 26 år siden. Ingen av studiedeltagerne var diagnostisert med diabetes mellitus før transplantasjon. Ved inklusjon hadde syv av pasientene etablert behandling med et peroralt antidiabetikum; fem ble behandlet med glipizid og to med glimepirid. Demografiske data ved baseline er oppgitt i Tabell 3.1.

**Tabell 3.1:** Demografiske data ved baseline, oppgitt i gjennomsnitt  $\pm$  SD eller antall.

Alder (år)	$63,6 \pm 10,9$
Kjønn (mann/kvinne)	16/9
BMI ( $\text{kg/m}^2$ )	$26,9 \pm 7,1$
Tid etter Tx* (år)	$3,5 \pm 5,3$
Donor (LD/DD)	7/18
Preemptiv Tx* (ja/nei)	4/20 + 1 ukjent
<hr/>	
Bruk av oralt antidiabetikum ved inklusjon (ja/nei)	7/18
Glipizid:	5
Glimepirid:	2
<hr/>	
<b>Blodtrykk (mmHg):</b>	
Systolisk blodtrykk	$144 \pm 19$
Diastolisk blodtrykk	$83 \pm 11$
<hr/>	
<b>Nyrefunksjon:</b>	
GFR ( $\text{ml/min}$ )**	$72,0 \pm 26,8$
Sitagliptindose (50 mg/100 mg)	3/22

\*Tx: Transplantasjon, LD: levende donor, DD: avdød donor.

\*\*GFR beregnet ved hjelp av Cockcroft-Gault-ligningen [92].



Sykdommen som førte til behov for nyretransplantasjon er ukjent for to av studiedeltagerne. Polycystisk nyresykdom var årsak til transplantasjon hos seks av pasientene, nefrosklerose var årsaken hos syv pasienter, IgA-nefritt hos tre pasienter, mens to pasienter ble transplantert på grunn av fokal segmental glomerusklerose. For de fem resterende pasientene var årsaken henholdsvis kronisk glomerulonefritt, kroniske pyelonefritter og hypertensjon, hypertensiv nefropati, Wegeners granulomatose og bilateral nyrekreft.

Sitagliptindosen ble justert i forhold til individuell nyrefunksjon. Kun tre av pasientene hadde  $\text{GFR} < 50 \text{ mL/min}$  den dagen de skulle starte med behandling, og fikk dermed 50 mg sitagliptin daglig. Resten av pasientene fikk 100 mg sitagliptin daglig.

## 3.2 Prøvetaking

### 3.2.1 Immunsuppressiv behandling

Tabell 3.2 viser hvilken immunsuppressiv behandling pasientene i studien benyttet. Oversikt over dose immunsuppressiva for den enkelte pasient er gjengitt i appendiks BI.

**Tabell 3.2:** Oversikt over immunsuppressiv behandling hos pasientene, oppgitt som antall og dose (mg/døgn) i gjennomsnitt  $\pm$  SD.

Type medikament	Antall (n = 25)	Dose (mg/døgn)
Ciklosporin	18	180 $\pm$ 49
Tacrolimus	5	3,2 $\pm$ 0,8
Everolimus	3	2,7 $\pm$ 1,3
Mykofenolat mofetil	17	1882 $\pm$ 281
Mykofenolat natrium	6	1020 $\pm$ 479
Prednisolon	24	5,2 $\pm$ 0,9

Gjennomsnittlig blodkonsentrasjon av immunosuppressive legemidler under studien er vist i Tabell 3.3. Blodkonsentrasjonen av immunosuppressive legemidler for den enkelte pasient under studien er gjengitt i appendiks BII.

**Tabell 3.3:** Blodkonsentrasjon ( $\mu\text{g/L}$ ) av immunosuppressive legemidler under studien, oppgitt i gjennomsnitt  $\pm$  SD.

Type medikament	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling	P-verdi*
Ciklosporin	90 $\pm$ 34	100 $\pm$ 40	108 $\pm$ 52	0,28
Tacrolimus	5,4 $\pm$ 1,2	5,0 $\pm$ 1,1	6,6 $\pm$ 1,2	0,04
Everolimus	8,7 $\pm$ 1,4	6,5 $\pm$ 1,8	6,4 $\pm$ 0,5	0,94
Mykofenolat**	3126 $\pm$ 2759	2409 $\pm$ 1311	2913 $\pm$ 1858	0,20

\*P-verdi for  $\Delta$  Sitagliptinbehandling - Baseline versus  $\Delta$  Kontrollperiode - Baseline.

\*\*Mykofenolat mofetil og mykofenolat natrium sett sammen.

Ingen signifikante forskjeller ble funnet for blodkonsentrasjonene av everolimus ( $p=0,94$ ) og mykofenolat ( $p=0,20$ ) under studien. Sitagliptinbehandling førte til en numerisk økning i blodkonsentrasjonen av CsA på gjennomsnittlig  $8\pm 31$   $\mu\text{g/L}$  relativt til kontrollperioden. Dette tilsvarte en gjennomsnittlig økning på  $8,9\pm 27,2$  %, men det var ingen statistisk signifikant forskjell mellom studieperiodene når begge ble sammenlignet med baseline ( $p=0,28$ ).

Kun fem pasienter ble behandlet med Tac, men blant disse pasientene ble blodkonsentrasjonen av Tac signifikant høyere ( $p=0,04$ ) etter endt periode med sitagliptinbehandling. Blodkonsentrasjonen av Tac økte gjennomsnittlig  $1,6\pm 1,0$   $\mu\text{g/L}$  relativt til kontrollperioden, og dette tilsvarte en gjennomsnittlig økning på  $34,8\pm 24,9$  %.

### 3.2.2 Biokjemiske analyser av blod og urin

Resultatene av de biokjemiske analysene av blod og totalprotein/kreatininratio i urin ved undersøkelsesdagene er vist i Tabell 3.4.

**Tabell 3.4:** Biokjemiske analyser av blod og urin ved undersøkelsesdagene, oppgitt i gjennomsnitt  $\pm$  SD eller median (range).

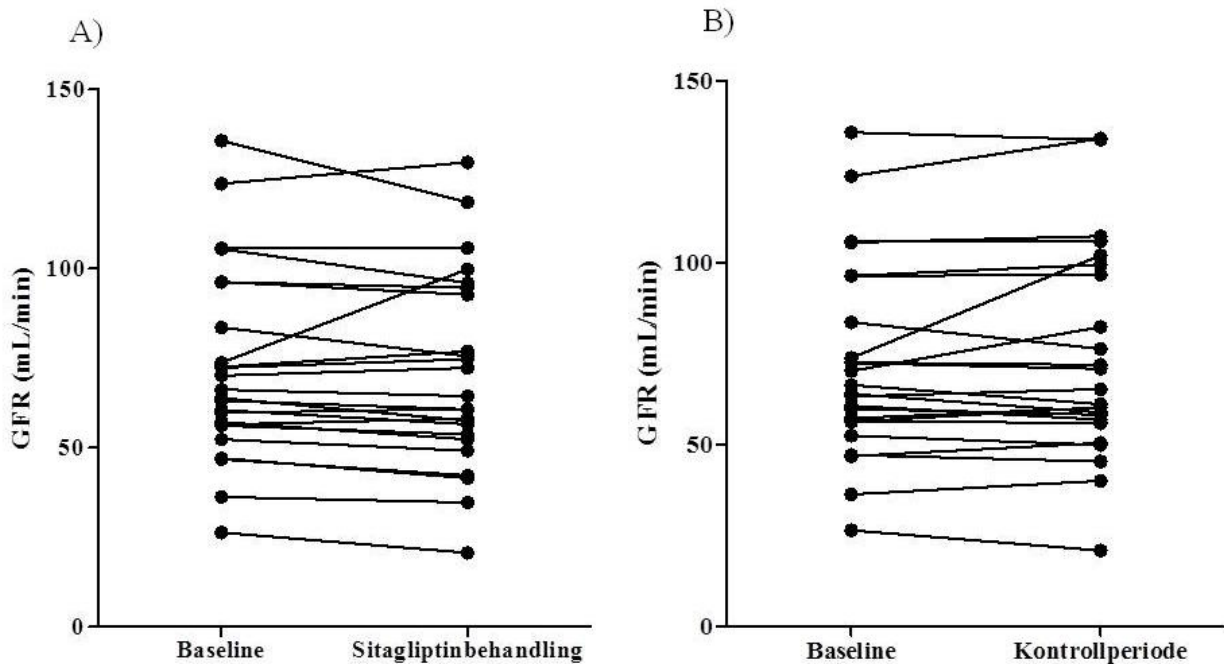
	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling	P-verdi*
<b>Blodprøver:</b>				
Hemoglobin (g/dL)	13,2 $\pm$ 1,5	13,0 $\pm$ 1,8	13,0 $\pm$ 1,7	0,88
Trombocytter (10 <sup>9</sup> /L)	239,2 $\pm$ 47,7	247,9 $\pm$ 72,9	235,3 $\pm$ 56,1	0,10
Leukocytter (10 <sup>9</sup> /L)	7,1 $\pm$ 1,5	7,3 $\pm$ 2,2	7,4 $\pm$ 2,1	0,64
Urinsyre ( $\mu$ mol/L)	420,3 $\pm$ 121,4	412,8 $\pm$ 114,2	436,6 $\pm$ 113,9	0,08
Natrium (mmol/L)	141,5 $\pm$ 1,7	142,0 $\pm$ 2,1	142,6 $\pm$ 2,1	0,19
Kalium (mmol/L)	3,8 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 0,5	3,9 $\pm$ 0,4	0,25
Kalsium (mmol/L)	2,37 $\pm$ 0,14	2,35 $\pm$ 0,14	2,34 $\pm$ 0,13	0,80
Fosfat (mmol/L)	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,2	0,46
Bilirubin total ( $\mu$ mol/L)	9,8 $\pm$ 3,2	9,2 $\pm$ 3,4	8,8 $\pm$ 2,5	0,41
ASAT (U/L)	23,0 (15-59)	22,0 (15-41)	21,0 (16-35)	0,87
ALAT (U/L)	22,5 (14-60)	21,0 (14-65)	20,0 (11-47)	0,16
LD (U/L)	207,1 $\pm$ 44,6	201,6 $\pm$ 41,3	198,8 $\pm$ 42,9	0,57
Alkalisk fosfatase (U/L)	78,7 $\pm$ 35,0	75,2 $\pm$ 33,8	71,4 $\pm$ 31,6	0,06
GT (U/L)	40,5 $\pm$ 26,7	48,7 $\pm$ 55,8	39,2 $\pm$ 34,3	0,09
Urea (mmol/L)	8,7 (4,6-23,3)	8,2 (3,5-29,1)	8,7 (5,9-22,4)	0,63
Kreatinin ( $\mu$ mol/L)	105 (50-251)	103 (48-319)	107 (57-306)	0,06
GFR (mL/min)**	72,0 $\pm$ 26,8	73,5 $\pm$ 28,8	70,4 $\pm$ 27,1	0,01
HbA1c (%)	6,8 (5,9-8,9)	6,7 (5,9-9,2)	6,5 (5,8-8,8)	0,12
CRP (mg/L)	2,1 (0,6-17,0)	2,0 (0,6-18,0)	1,6 (0,6-11,0)	0,12
<b>Urinprøver:</b>				
Totalprotein/Kreatinin-ratio (mg/mmol kreat.)***	9 (5-33)	8 (6-68)	9 (6-37)	0,86

\*P-verdi for  $\Delta$  Baseline - Sitagliptinbehandling versus  $\Delta$  Baseline - Kontrollperiode.

\*\*GFR beregnet ved hjelp av Cockcroft-Gault-ligningen [92].

\*\*\*Proteinuri ved protein/kreatinin-ratio  $>30$  mg/mmol ( $n=13$ ).

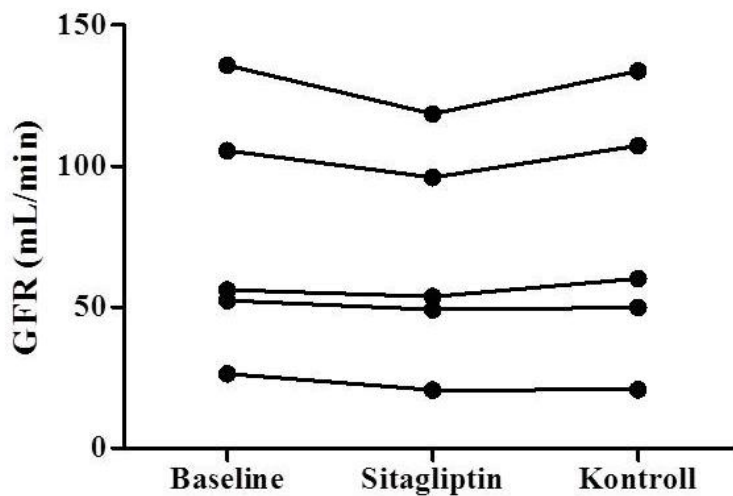
Som vist i Tabell 3.4, førte sitagliptinbehandling til en statistisk signifikant reduksjon i GFR på  $-3,9 \pm 6,8$  % ( $p=0,01$ ). Etter behandlingsperioden med sitagliptin var GFR  $3,0 \pm 5,1$  mL/min lavere i forhold til kontrollperioden (Figur 3.1). Serumkreatinin viste ingen signifikant forskjell mellom sitagliptinbehandling og kontroll (Tabell 3.4).



**Figur 3.1: Individuell endring i GFR (mL/min) under studien, A) fra baseline til etter perioden med sitagliptinbehandling, B) fra baseline til etter kontrollperioden. Endringene følger samme trend etter begge studieperiodene, men når det gjelder pasienter som fikk redusert GFR under studien, var reduksjonen generelt større etter sitagliptinbehandling enn etter kontrollperioden.**

#### **Sammenheng mellom økt blodkonsentrasjon av Tac og redusert GFR**

Gjennomsnittlig  $\Delta$  GFR for de fem pasientene som benyttet Tac var  $-7,6 \pm 6,0$  mL/min og  $-0,9 \pm 3,8$  mL/min etter henholdsvis perioden med sitagliptinbehandling og kontrollperioden. Forskjellen mellom de to studieperiodene tenderte til å være statistisk signifikant ( $p=0,08$ , 95 % KI;  $-14,86$ ,  $1,42$ ). Se Figur 3.2.



**Figur 3.2:** Individuell endring i GFR (mL/min) under studien for de fem pasientene som benyttet Tac. Alle pasientene som benyttet Tac fikk redusert GFR etter sitagliptinbehandling. GFR forholdt seg relativt uforandret etter kontrollperioden sammenlignet med baseline.

**Tabell 3.5:** Endring i GFR (mL/min) og % mellom perioden med sitagliptinbehandling og kontrollperioden, oppgitt i gjennomsnitt  $\pm$  SD.

	$\Delta$ GFR (mL/min)	% endring
<b>Sitagliptinbehandling – Kontroll</b>		
Pasienter på Tac	$-6,7 \pm 6,6$	$-6,9 \pm 5,4$
Pasienter uten Tac	$-2,0 \pm 4,4$	$-3,1 \pm 7,0$
95 % konfidensintervall	$-0,376, 9,743$	
P-verdi	0,07	

Som vist i Tabell 3.5, hadde pasientene som benyttet Tac generelt en større reduksjon i GFR etter perioden med sitagliptinbehandling enn de resterende pasientene. Forskjellen mellom disse to gruppene tenderte til å være statistisk signifikant ( $p=0,07$ ).

Sitagliptinbehandling førte også til en numerisk ikke-signifikant reduksjon i alkalisk fosfatase ( $p=0,06$ ) samt en numerisk ikke-signifikant økning i urinsyre ( $p=0,08$ ), men disse endringene er ikke vurdert til å være klinisk relevante. Ingen betydningsfulle endringer ble observert for andre biokjemiske parametre i blod eller totalprotein/kreatininratio i urin.

Resultatene fra måling med urinstix viste at en person hadde svakt utslag for proteiner (1+) og relativt sterkt utslag for leukocytter (2+) ved baseline. Proteinmålingen var negativ og leukocyttnmålingen redusert (1+) etter kontrollperioden, og begge målingene var negative etter sitagliptinbehandling. En pasient hadde sterkt utslag for proteiner (3+) ved baseline, men ingen utslag etter kontrollperioden og sitagliptinbehandling. En pasient hadde relativt sterkt utslag (2+) for proteiner ved baseline og etter kontrollperioden. Dette hadde økt (3+) etter sitagliptinbehandlingen.

Tre pasienter hadde utslag for glukose ved baseline på henholdsvis 1+, 2+ og 4+. Disse målingene ble redusert etter kontrollperioden (henholdsvis negativ, 1+ og 2+) og videre redusert etter sitagliptinbehandling (henholdsvis negativ, negativ og 1+).

### 3.2.3 Kroppsmål og blodtrykk

Som vist i Tabell 3.6, ble ingen klinisk relevante eller statistisk signifikante endringer funnet for BMI under studien. Etter sitagliptinbehandling ble det observert en moderat reduksjon i både systolisk ( $-3,5 \pm 13,6$  mmHg) og diastolisk blodtrykk ( $-1,4 \pm 6,9$  mmHg) relativt til kontrollperioden, men disse reduksjonene var ikke statistisk signifikante.

**Tabell 3.6:** Kroppsmål og blodtrykk ved undersøkelsesdagene, oppgitt i gjennomsnitt  $\pm$  SD.

	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling	P-verdi*
<b>Kroppsmål:</b>				
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26,9 $\pm$ 7,1	26,9 $\pm$ 7,1	26,7 $\pm$ 7,1	0,10
<b>Blodtrykk (mmHg):</b>				
Systolisk blodtrykk	144 $\pm$ 19	146 $\pm$ 17	142 $\pm$ 16	0,21
Diastolisk blodtrykk	83 $\pm$ 11	81 $\pm$ 10	79 $\pm$ 9	0,33

---

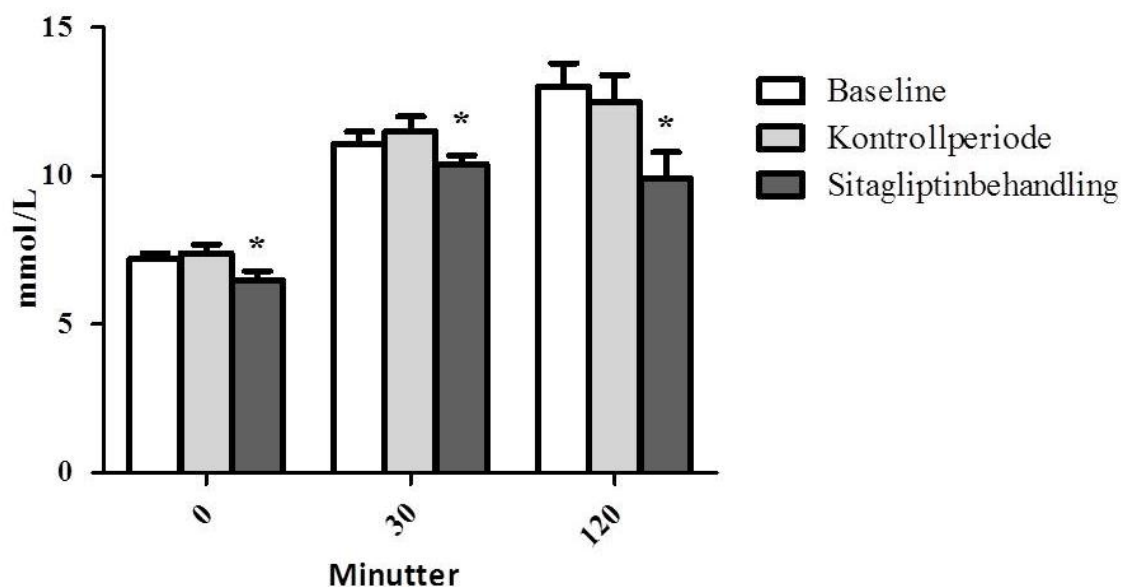
\*P-verdi for  $\Delta$  Baseline - Sitagliptinbehandling versus  $\Delta$  Baseline - Kontrollperiode.

### 3.3 Oral glukosetoleransetest

Oral glukosetoleransetest (OGTT) ble ikke utført på to av pasientene under hele pilotstudien, men fastende glukose ble målt. Endring i fastende glukosekonsentrasjon er derfor beregnet for alle 25 pasientene, mens endringer i glukosekonsentrasjon 30 minutter og 120 minutter etter OGTT er beregnet på bakgrunn av data for 23 pasienter.

Gjennomsnittlig reduksjon i  $\Delta$  glukosekonsentrasjon for sitagliptinbehandling versus baseline sammenlignet med kontrollperioden versus baseline var statistisk signifikante for både fastende prøve ( $p=0,001$ , 95 % KI; -1,413, -0,387) og de postprandiale prøvene 30 minutter ( $p=0,002$ , 95 % KI; -1,512, -0,384) og 120 minutter ( $p=0,001$ , 95 % KI; -3,808, -1,080) etter OGTT. Etter sitagliptinbehandling var glukosekonsentrasjonene  $0,9 \pm 1,2$ ,  $0,9 \pm 1,4$  og  $2,4 \pm 3,3$  mmol/L lavere i forhold til kontrollperioden, og dette tilsvarte en reduksjon på  $-10,8 \pm 13,8$  %,  $-7,5 \pm 11,1$  % og  $-18,5 \pm 26,9$  % for henholdsvis fastende prøve og prøvene 30 minutter og 120 minutter etter OGTT. Se Figur 3.3 og Tabell 3.7.

Det så ikke ut til å ha betydning for resultatene om pasientene startet med eller uten sitagliptinbehandling. Glukosekonsentrasjonene for hver pasient er gjengitt i appendiks BIII.



**Figur 3.3: Glukosekonsentrasjoner (mmol/L) ved alle tre undersøkelsesdagene, oppgitt i gjennomsnitt og SEM.**

**Tabell 3.7:** Oversikt over glukosekonsentrasjonene (mmol/L) etter OGTT ved alle tre undersøkelsesdagene, oppgitt i gjennomsnitt  $\pm$  SD (SEM).

	0 minutter (fastende)	30 minutter	120 minutter
Baseline	7,2 $\pm$ 1,2 (0,2)	11,1 $\pm$ 2,0 (0,4)	13,0 $\pm$ 3,8 (0,8)
Kontrollperiode	7,4 $\pm$ 1,6 (0,3)	11,5 $\pm$ 2,4 (0,5)	12,5 $\pm$ 4,5 (0,9)
Sitagliptinbehandling	6,5 $\pm$ 1,3 (0,3)	10,4 $\pm$ 11,7 (0,3)	9,9 $\pm$ 4,1 (0,9)
P-verdi*	0,001	0,002	0,001

\*P-verdi for  $\Delta$  Sitagliptinbehandling - Baseline versus  $\Delta$  Kontrollperiode - baseline.

### 3.4 Hjemmemåling av blodsukker

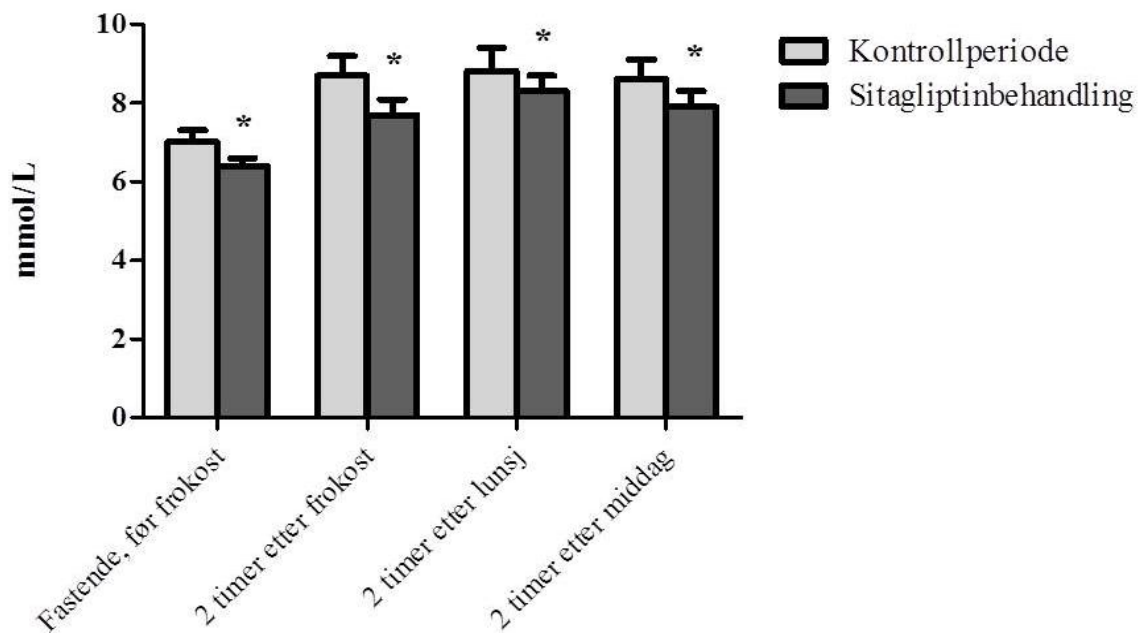
Det var kun én pasient som ikke leverte skjema for hjemmemåling av blodsukker for begge periodene i studien. For de resterende pasientene var det varierende hvor mange målinger som ble utført. Alle som leverte skjema for begge periodene utførte fastende målinger om morgenen (n=24). For målingene to timer etter frokost, to timer etter lunsj og to timer etter middag forlår det data for henholdsvis 23, 19 og 22 pasienter. Hovedandelen av pasientene meldte at de sjeldent spiste kveldsmat, eller at de ikke var våkne til å foreta måling to timer etter dette måltidet. Dette målepunktet ble dermed fjernet fra den statistiske analysen.

Sammenlignet med kontrollperioden, ga sitagliptinbehandling statistisk signifikant reduksjon i blodsukker ved alle målepunktene. Sitagliptinbehandling førte til en gjennomsnittlig reduksjon i blodsukker relativt til kontrollperioden på -0,6 $\pm$ 0,8 mmol/L (-7,7 $\pm$ 9,5 %), -0,9 $\pm$ 1,3 mmol/L (-9,6 $\pm$ 11,1 %), -1,4 $\pm$ 2,3 mmol/L (-18,7 $\pm$ 28,8 %) og -0,3 $\pm$ 2,0 mmol/L (-8,1 $\pm$ 7,2 %) for målingene utført henholdsvis fastende før frokost, to timer etter frokost, to timer etter lunsj og to timer etter middag. Se Tabell 3.8 og Figur 3.4.

**Tabell 3.8:** Oversikt over glukosekonsentrasjonene (mmol/L) under hjemmemålingene, oppgitt som gjennomsnitt av de fjorten siste dagene i hver av periodene  $\pm$  SD (SEM).

	Fastende, før frokost	2 timer etter Frokost	2 timer etter Lunsj	2 timer etter middag
Sitagliptinbehandling (S)	6,4 $\pm$ 1,0 (0,2)	7,7 $\pm$ 1,8 (0,4)	8,3 $\pm$ 2,0 (0,4)	7,9 $\pm$ 1,8 (0,4)
Kontrollperiode (K)	7,0 $\pm$ 1,3 (0,3)	8,7 $\pm$ 2,4 (0,5)	8,8 $\pm$ 3,1 (0,6)	8,6 $\pm$ 2,2 (0,5)
95 % konfidensintervall	-0,937, -0,271	-1,538, -0,428	-1,654, -0,473	-1,165, -0,389
P-verdi for $\Delta$ S-K	0,001	0,001	0,001	<0,001





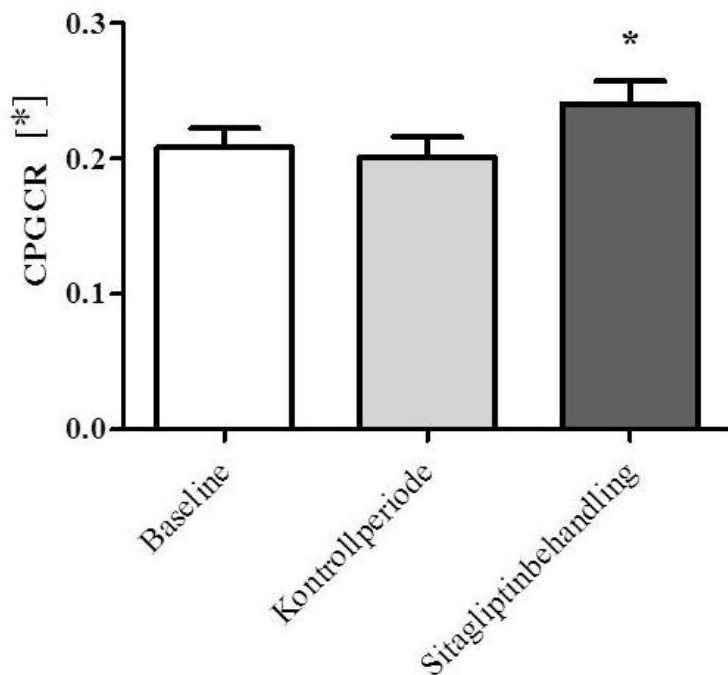
**Figur 3.4:** Hjemmemåling av blodsukker (mmol/L), oppgitt som gjennomsnitt av de fjorten siste dagene i hver av periodene og SEM.

### 3.5 C-peptid og beregning av CPGCR

Fra pilotstudien manglet det data for én pasient til å kunne beregne C-peptid til glukose, kreatinin ratio (CPGCR) ved alle tre undersøkelsesdagene. CPGCR er derfor beregnet på bakgrunn av data for 24 pasienter.

Gjennomsnittlig  $\Delta$  CPGCR var  $0,032 \pm 0,062$  og  $-0,007 \pm 0,042$  C-peptid (nmol/L) / glukose (mmol/L) x kreatinin ( $\mu$ mol/L) etter henholdsvis perioden med sitagliptinbehandling og kontrollperioden. Etter sitagliptinbehandling var CPGCR  $0,037 \pm 0,040$  C-peptid (nmol/L) / glukose (mmol/L) x kreatinin ( $\mu$ mol/L) høyere i forhold til kontrollperioden. Dette tilsvarte en økning på  $22,6 \pm 26,8$  %, og det var signifikant forskjell mellom de to studieperiodene ( $p < 0.001$ , 95 % KI; 0.022, 0.056). Se Figur 3.5.

Konsentrasjonen av C- peptid i pasientprøvene er gjengitt i appendiks BIV.



**Figur 3.5: CPGCR [\*] ved hver av undersøkelsesdagene, oppgitt i gjennomsnitt og SEM (n=24).** Baseline;  $0,208 \pm 0,067$  (SEM: 0,014), kontrollperiode;  $0,201 \pm 0,073$  (SEM: 0,015), sitagliptinbehandling;  $0,240 \pm 0,082$  (SEM: 0,017).

[\*]CPGCR beregnet som:  $(C\text{-peptid (nmol/L)} \times 100) / (\text{glukose (mmol/L)} \times \text{kreatinin } (\mu\text{mol/L}))$ .

## 3.6 Insulinsekresjon og -sensitivitet

### 3.6.1 Insulinsekresjon

Fra pilotstudien manglet det data for seks pasienter til å kunne beregne insulinsekresjon ved alle tre undersøkelsesdagene. Insulinsekresjon (1. – og 2.fase) er derfor beregnet på bakgrunn av data for 19 pasienter.

Etter sitagliptinbehandling var 1.fase-insulinsekresjon  $482,9 \pm 579,3$  pmol/L høyere i forhold til kontrollperioden. Dette tilsvarte en økning på  $87,7 \pm 136,9$  %, og det var statistisk signifikant forskjell mellom de to studieperiodene når begge ble sammenlignet med baseline ( $p=0,002$ , 95 % KI; 203,6, 762,1). Gjennomsnittlig  $\Delta$  1.fase-insulinsekresjon var  $442,5 \pm 615,9$  pmol/L etter sitagliptinbehandling og  $-40,3 \pm 404,2$  pmol/L etter kontrollperioden.

Sitagliptinbehandling førte til en gjennomsnittlig økning i 2.fase-insulinsekresjon på  $107,2 \pm 136,0$  pmol/L relativt til kontrollperioden. Dette tilsvarte en økning på  $43,8 \pm 57,8$  %, og det var statistisk signifikant forskjell mellom de to studieperiodene når begge ble sammenlignet med baseline ( $p=0,003$ , 95 % KI; 41,7, 172,8). Gjennomsnittlig  $\Delta$  2.fase-insulinsekresjon var  $98,8 \pm 146,0$  pmol/L etter sitagliptinbehandling og  $-8,5 \pm 89,0$  pmol/L etter kontrollperioden.

Median 1.- og 2.fase-insulinsekresjon for alle tre undersøkelsesdagene samt median endring i 1.- og 2.fase-insulinsekresjon fra baseline er vist i Tabell 3.9. Insulinkonsentrasjonene for den enkelte pasient er gjengitt i appendiks BV.

**Tabell 3.9:** Median (range) insulinsekresjon ved undersøkelsesdagene og median (range) endring i insulinsekresjon fra baseline ( $n=19$ ), oppgitt i pmol/L.

	1.fase-insulinsekresjon [*]	2.fase-insulinsekresjon [**]
Baseline	838,0 (433,4-3713,7)	278,3 (155,7-918,5)
Kontrollperiode	925,5 (112,6-3322,3)	259,2 (129,5-814,8)
Sitagliptinbehandling	1407,0 (571,5-3640,0)	375,8 (181,4-891,2)
Kontrollperiode – Baseline ( $\Delta K$ )	15,5 (-729,9-637,1)	-5,0 (-165,7-148,3)
Sitagliptin – Baseline ( $\Delta S$ )	393,3 (-381,9-2417,0)	80,0 (-87,4-577,8)
P-verdi ( $\Delta S$ versus $\Delta K$ )	0,002	0,003

[\*] 1.fase-insulinsekresjon beregnet som:

$$1283 + 1,829 \times Ins_{30}(\text{pmol/L}) - 138,7 \times Gluc_{30}(\text{mmol/L}) + 3,772 \times Ins_0(\text{pmol/L})$$

[\*\*] 2.fase-insulinsekresjon beregnet som:

$$287 + 0,4164 \times Ins_{30}(\text{pmol/L}) - 26,07 \times Gluc_{30}(\text{mmol/L}) + 0,9226 \times Ins_0(\text{pmol/L})$$

### 3.6.2 Insulinsensitivitet

Fra pilotstudien manglet det data for fem pasienter til å kunne beregne insulinsensitivitet ved alle tre undersøkelsesdagene. Gjennomsnittlig insulinsensitivitet er derfor beregnet på bakgrunn av data for 20 pasienter.

Insulinsensitivitet ble beregnet som:

$$ISI_{TX} = 0,208 - 0,0032 \times BMI (\text{kg/m}^2) - 0,0000645 \times Ins_{120}(\text{pmol/L}) - 0,00375 \times Gluc_{120}(\text{mmol/L}).$$

Gjennomsnittlig  $ISI_{TX}$  var  $0,027997 \pm 0,039888$ ,  $0,036069 \pm 0,036696$  og  $0,045943 \pm 0,038737$  for henholdsvis baseline, kontrollperioden og perioden med sitagliptin.

Etter perioden med sitagliptinbehandling var  $ISI_{TX}$   $0,009874 \pm 0,031217$  27 høyere i forhold til kontrollperioden, noe som tilsvarte en økning på  $119 \pm 665$  %. Det var ingen signifikant forskjell mellom de to studieperiodene når begge ble sammenlignet med baseline ( $p=0,17$ , 95 % KI:  $-0,004736$ ,  $0,02448$ ). Gjennomsnittlig  $\Delta ISI_{TX}$  var  $0,017946 \pm 0,037722$  etter perioden med sitagliptinbehandling og  $0,008072 \pm 0,016534$  etter kontrollperioden.

### 3.7 Mikrovaskulær endotelfunksjon

$AUC_{ACh}$  var ikke mulig å bestemme hos en av pasientene den ene undersøkelsesdagen på grunn av ufullstendig iontoforese. Postokklusiv reaktiv hyperemitest (PORH) ble ikke utført på to av pasientene ved baseline på grunn av tekniske problemer. En pasient ble ekskludert fra analysen på grunn av ufullstendig iontoforese ved alle tre undersøkelsesdagene, mens fem av pasientene oppfylte eksklusjonskriteriet om uspesifikk vasodilatasjon over 200 AU x min ved en av undersøkelsesdagene. Totalt seks pasienter ble dermed fjernet fra beregning av resultater.

Sitagliptin hadde ingen signifikant effekt på endotelfunksjonen, verken målt som  $AUC_{ACh}$  eller  $AUC_{Rh}$  (Tabell 3.10). Resultatene for den enkelte pasient er gjengitt i appendiks BVI.

**Tabell 3.10:** Endring i endotelfunksjon etter sitagliptinbehandling og kontrollperioden målt mot baseline, oppgitt i gjennomsnitt  $\pm$  SD.

Parametere	$\Delta$ Sitagliptinbehandling – Baseline	$\Delta$ Kontrollperiode - Baseline	p-verdi
$AUC_{ACh}$ (AU x min)	$32,3 \pm 270,8$ (n = 18)	$18,9 \pm 230,4$ (n = 18)	0,78
$AUC_{Rh}$ (AU x min)	$6,9 \pm 24,0$ (n = 17)	$8,2 \pm 25,9$ (n = 17)	0,43

Endringen i hudtemperatur under undersøkelsene var minimal ( $0,3 \pm 0,3$  °C).

### 3.8 Mikro-CRP

Det manglet data for to pasienter til å kunne beregne konsentrasjonen av mikro-CRP (mCRP) ved alle tre undersøkelsesdagene. Gjennomsnittlig mCRP er derfor beregnet på bakgrunn av data for 23 pasienter.

Gjennomsnittlig mCRP var  $4884,4 \pm 3961,2$ ,  $4711,7 \pm 3771,3$  og  $3633,2 \pm 3054,2$  ng/mL for henholdsvis baseline, kontrollperioden og perioden med sitagliptin. Sitagliptinbehandling førte til en ikke-signifikant reduksjon i mCRP på  $-1078,4 \pm 3068,0$  ng/mL ( $-3,3 \pm 63,3$  %) relativt til kontrollperioden ( $p=0,11$ , 95 % KI; -278, 244). Konsentrasjonen av mCRP for den enkelte pasient er gjengitt i appendiks BVII.

### 3.9 sTNFR-1

Det manglet data for én pasient til å kunne beregne konsentrasjonen av sTNFR-1 ved alle tre undersøkelsesdagene. Gjennomsnittlig sTNFR-1 er derfor beregnet på bakgrunn av data for 24 pasienter.

Sitagliptinbehandling førte til en signifikant gjennomsnittlig reduksjon i sTNFR-1 på  $-17 \pm 36$  pg/mL ( $-4,0 \pm 10,7$  %) relativt til kontrollperioden når begge ble målt mot baseline ( $p=0,03$ , 95 % KI; -32,3, -1,5). Konsentrasjonen av sTNFR-1 var  $393 \pm 81$  pg/mL ved baseline,  $376 \pm 81$  pg/mL etter kontrollperioden og  $359 \pm 81$  pg/mL etter perioden med sitagliptinbehandling. Gjennomsnittlig  $\Delta$  sTNFR-1 var  $-34 \pm 51$  pg/mL etter perioden med sitagliptinbehandling og  $-17 \pm 45$  pg/mL etter kontrollperioden. Konsentrasjonen av sTNFR-1 i for den enkelte pasient er gjengitt i appendiks BVIII.

### 3.10 VCAM-1

Det manglet data for én pasient til å kunne beregne konsentrasjonen av VCAM-1 ved alle tre undersøkelsesdagene. Gjennomsnittlig konsentrasjon av VCAM-1 er derfor beregnet på bakgrunn av data for 24 pasienter.

Gjennomsnittlig konsentrasjon av VCAM-1 var  $945 \pm 505$ ,  $850 \pm 352$  og  $820 \pm 298$  ng/mL for henholdsvis baseline, kontrollperioden og perioden med sitagliptin. Sitagliptinbehandling førte til en gjennomsnittlig reduksjon i VCAM-1 på  $-30 \pm 198$  ng/mL ( $0,1 \pm 20,9$  %) relativt til kontrollperioden, men det var ingen signifikant forskjell mellom de to studieperiodene når begge ble målt mot baseline ( $p=0,46$ , 95 % KI; -114, 54). Konsentrasjonen av VCAM-1 for den enkelte pasient er gjengitt i appendiks BIX.

### 3.11 Adiponectin

Det manglet data for én pasient til å kunne beregne konsentrasjonen av adiponectin ved alle tre undersøkelsesdagene. Gjennomsnittlig konsentrasjon av adiponectin er derfor beregnet på bakgrunn av data for 24 pasienter.

Gjennomsnittlig konsentrasjon av adiponectin var  $58\,496 \pm 40\,075$ ,  $62\,946 \pm 52\,222$  og  $66\,268 \pm 51\,535$  ng/mL for henholdsvis baseline, kontrollperioden og perioden med sitagliptin. Etter sitagliptinbehandling var konsentrasjonen av adiponectin  $3\,323 \pm 62\,849$  ng/mL ( $28,2 \pm 85,6$  %) høyere i forhold til kontrollperioden, men det var ingen signifikant forskjell mellom studieperiodene når begge ble målt mot baseline ( $p=0,80$ , 95 % KI; -29 866, 23 221). Konsentrasjonen av adiponectin for den enkelte pasient er gjengitt i appendiks BX.

### 3.12 IL-10

Konsentrasjonen av interleukin (IL)-10 i pasientprøvene var langt under den minste detekterbare grensen for ELISA-kitet, og var dermed ikke mulig å detektere med denne analysemetoden.

### 3.13 Adherence

Etter endt sitagliptinbehandling ble adherence kontrollert ved tablettelling. Totalt tre pasienter rapporterte å ha glemt en tablett, noe som stemte med utført tablettelling (96,4 % adherence). Fra pilotstudien manglet det tre tabletter for den ene pasienten i forhold til beregnet overskudd for behandlingsperioden. Denne pasienten hevdet å ha fulgt korrekt dosering, og at overskuddet av tabletter var mistet. For de resterende pasientene viste tablettellingen, samt utspørring av pasientene, 100 % adherence.

### 3.14 Bivirkninger

Sitagliptin (Januvia<sup>®</sup>) var generelt godt tolerert av pasientene i studien. En pasient ble tatt ut av pilotstudien grunnet mulige bivirkninger (nattesvette uten at dette skyldtes hypoglykemi). En annen pasient fra den videre studien hadde god effekt av sitagliptin under studien, og opplevde ingen bivirkninger. Pasienten fortsatte derfor bruken av sitagliptin etter at studien var avsluttet. Denne pasienten ble senere innkalt til konsultasjon på hjemstedet grunnet uttalt kvalme med sviktende matinntak. Etter medikamentell genese ble sitagliptin seponert, og det ble konkludert med at bivirkningene skyldtes sitagliptin.

Ingen av de andre studiedeltakerene rapporterte om symptomer som kan relateres til sitagliptinbehandling.

I pilotstudien ble totalt to hypoglykemiske episoder registrert i hjemmemålingsskjemaene. Den ene pasienten målte en fastende blodglukose på 2,8 mmol/L, mens den andre pasienten utførte en tilleggsmåling på 3,3 mmol/L etter å ha våknet med følingssymptomer. Det siste tilfellet skyldtes trolig alkoholinntak kvelden før. Begge disse pasientene ble også behandlet med glipizid. Fra den videre studien ble det kun registrert én hypoglykemisk episode, hvor en pasient hadde blodglukose på 3,3 mmol/L to timer etter frokost. Denne pasienten ble ikke behandlet med andre antidiabetika.

## 4 Diskusjon

I denne studien ble sikkerhet og effekt av sitagliptin (Januvia®) undersøkt på pasienter som har utviklet diabetes/nedsatt glukosetoleranse etter nyretransplantasjon. Hovedfunnene viser at sitagliptin førte til en vektøytral reduksjon i både fastende og postprandial blodglukose gjennom hele døgnet, og at medikamentet har en positiv innvirkning på insulinsekresjon. Studien viste ikke relevante effekter av sitagliptin verken på endotelfunksjon eller plasmamarkører for kardiovaskulær risiko. Ingen alvorlige bivirkninger ble registrert.

### 4.1 Oral glukosetoleransetest

Resultatene fra den orale glukosetoleransetesten (OGTT) viser at sitagliptin signifikant reduserer både fastende og postprandial blodglukose, spesielt blodglukosen 120 minutter etter OGTT. Resultatet for redusert fastende glukose i denne studien samsvarer med observert reduksjon etter toårsbehandling med sitagliptin kombinert med metformin i pasienter med DMT2 (-0,6 mmol/L, -0,8, -0,3) [75]. I følge en studie utført ved OUS Rikshospitalet, kan disse reduksjonene være av stor klinisk relevans. Valderhaug *et al.* undersøkte langtidseffekter av redusert glukosetoleranse etter nyretransplantasjon, og fant at hver økning på 1 mmol/L i fastende plasmaglukose eller 120 minutter etter OGTT var assosiert med henholdsvis 11 % og 5 % økt risiko for død fra enhver årsak, og 19 % og 6 % økt risiko for død av kardiovaskulære sykdommer [93]. Bedring i kontroll av fastende og postprandial blodglukose med sitagliptin, kan derfor potensielt bedre langtidsoverlevelsen etter nyretransplantasjon, uavhengig av andre faktorer, ved å redusere risikoen for kardiovaskulær sykdom og tidlig død.

#### *Hypoglykemi og hjemmemåling av blodsukker*

Sitagliptin virker antidiabetisk via potent og selektiv hemming av enzymet DPP-4 som inaktiverer GLP-1 og GIP. Begge disse inkretinhormonene, men hovedsakelig GLP-1, er viktige signalsubstanser som har en nøkkelrolle i å opprettholde normale glukosekonsentrasjoner etter inntak av karbohydrater. GLP-1 stimulerer insulinsekresjon og hemmer glukagonproduksjon via en glukoseavhengig mekanisme, og disse effektene dempes når blodglukosen når de nedre grensene av normale glukosekonsentrasjoner (se Tabell 1.1). Det er derfor forventet at bruk av sitagliptin medfører lav risiko for hypoglykemiske episoder [61]. I denne studien ble det observert totalt tre separate hypoglykemiske målinger for tre



forskjellige pasienter. Disse episodene skyldtes antageligvis ikke en effekt av sitagliptin alene. For to av pasientene var årsaken trolig samtidig glipizidbehandling, og én av disse pasientene utførte en hypoglykemisk tilleggsmåling om natten etter alkoholinntak kvelden før. Den siste pasienten førte opp en hypoglykemisk måling to timer etter frokost. Siden denne pasienten lå langt over grensen for hypoglykemi under studien for øvrig, kan dette eventuelt skyldes at det ble spist lite til frokost eller at målingen ble utført mer enn to timer etter frokost.

Resultatene fra hjemmemåling av blodsukker viser at sitagliptin signifikant reduserer fastende og postprandial blodglukose ved alle målepunktene, noe som understøtter resultatene fra OGTT i denne studien. Hepatisk glukoseproduksjon er en viktig faktor for fastende glukosekonsentrasjoner. Det er derfor sannsynlig at redusert fastende blodglukose er et resultat av både økt insulinsekresjon og reduserte glukagonnivåer, som fører til redusert hepatisk glukoseproduksjon i løpet av natten [62].

Hjemmemåling av blodsukker er en metode med svakheter, da nøyaktigheten i resultatene avhenger av at målingene utføres relativt nøyaktig to timer etter måltid. I denne studien var det i tillegg varierende hvor mange målinger pasientene utførte. Hver pasient fikk utdelt et blodsukkerapparat av samme type, og det ble gitt opplæring i bruk før pasientene viste at de mestret å utføre blodsukkermåling selv. I og med at det er samsvar mellom resultatene fra OGTT og hjemmemåling av blodsukker, tyder dette på at hjemmemålingene er korrekt utført. Det var imidlertid fordelaktig at pasientene utførte hjemmemåling av blodsukker. På denne måten ble det vist at sitagliptin reduserer både fastende og postprandial blodglukose gjennom hele døgnet, og ikke bare under OGTT. Resultatene fra hjemmemålingene understøtter i tillegg resultatene fra OGTT i denne studien.

### ***Glykemisk kontroll***

Et generelt behandlingsmål for pasienter med DMT2 er å senke  $HbA1c \leq 7\%$ . Siden pasienter med NODAT har avansert aterosklerose og høy kardiovaskulær risiko, bør ikke redueringen av  $HbA1c$  komme på bekostning av hypoglykemiske episoder og vektøkning, da dette kan øke kardiovaskulær risiko [15]. Nåværende retningslinjer fra KDIGO ("Kidney Disease: Improving Global Outcomes") anbefaler  $HbA1c$  7 – 7,5 % som et behandlingsmål for nyretransplanterte pasienter, men presiserer at  $HbA1c \leq 6,0\%$  må unngås dersom det oppstår hyppige hypoglykemiske episoder [94]. Sitagliptin har en moderat glukosesenkende

effekt sammenlignet med tradisjonelle sulfonylurea og metformin. En meta-analyse av 41 randomiserte kliniske studier viste at gliptiner (inkludert sitagliptin, vildagliptin, saxagliptin og alogliptin) signifikant reduserte HbA1c med 0,6 % (0,5-0,7 %) etter 12 uker sammenlignet med placebo, og at denne effekten var lik både som monoterapi og i kombinasjon med andre antidiabetika [95]. HbA1c reflekterer gjennomsnittlig plasmaglukose over de foregående åtte til 12 ukene [13], men i denne studien bestod perioden med sitagliptinbehandling på fire uker, og var derfor ikke av lang nok varighet til å kunne vurdere effekt på HbA1c. Etter at denne studien var gjennomført, ble det publisert et lite arbeid hvor effekten av tre måneders behandling med sitagliptin ble demonstrert på nyretransplanterte pasienter med NODAT. Lane *et al.* viste at sitagliptin førte til en signifikant forbedret HbA1c fra baseline på  $7,2 \% \pm 0,1 \%$  til  $6,7 \% \pm 0,2 \%$  ( $p=0,002$ ) [96].

Det var vanskelig å finne pasienter som passet inklusjonskriteriene i løpet av den korte rekrutteringsperioden, og studiedeltakerene var generelt moderat hyperglykemiske. Raz *et al.* undersøkte effekten av sitagliptin som monoterapi i pasienter med DMT2, og fant at pasienter med baseline HbA1c  $\geq 9 \%$  opplevde større reduksjoner i HbA1c med 100 mg sitagliptin ( $-1,20 \%$ ) enn pasienter med HbA1c  $< 8 \%$  ( $-0,44 \%$ ) [62]. Pasientene i denne studien hadde en median baseline HbA1c på  $6,8 \%$  ( $5,9-8,9 \%$ ), og det er dermed tenkelig at en større relativ effekt av sitagliptin kunne blitt observert dersom pasientene hadde hatt høyere HbA1c ved baseline (mer hyperglykemiske).

## 4.2 Insulinsekresjon og – sensitivitet

### *Insulinsekresjon*

Grunnet ufullstendige datasett, kunne ikke insulinsekresjon beregnes for alle pasientene i studien. Sitagliptinbehandling førte allikevel til en signifikant gjennomsnittlig økning i både 1.- og 2. fase insulinsekresjon på henholdsvis  $87,7 \pm 136,9 \%$  og  $43,8 \pm 57,8 \%$  ( $n=19$ ). Stumvolls algoritme ble benyttet for å beregne fase 1 og fase 2 insulinsekresjon. Disse ligningene viser at beregnet insulinsekresjon vil øke ved høyere fastende - og 30 minutters insulinkonsentrasjon samt lavere glukosekonsentrasjon 30 minutter etter OGTT. Det er derfor samsvar mellom disse resultatene og glukoseresultatene fra OGTT, som viser at sitagliptin reduserer både fastende og postprandial glukose via en glukoseavhengig stimulering av

insulinsekresjon fra pankreatiske  $\beta$ -celler, samt nedregulering av glukagon fra pankreatiske  $\alpha$ -celler.

C-peptid har høy reproduserbarhet og utskilles i den systemiske sirkulasjonen i et nært forhold til insulin. Måling av C-peptid er derfor en egnet metode for å undersøke  $\beta$ -cellefunksjon. C-peptid til glukose, kreatinin ratio (CPGCR) ble beregnet på bakgrunn av fastende konsentrasjoner av C-peptid (nmol/L), glukose (mmol/L) og kreatinin ( $\mu$ mol/L), og kalkulert verdi korrigerer både for høye glukosekonsentrasjoner og nyrefunksjon. Nyretransplanterte pasienter har som nevnt redusert nyrefunksjon, og dermed kan CPGCR gi et bedre mål på insulinsekresjon i denne populasjonen [85].

I overensstemmelse med både 1.- og 2.fase-insulinsekresjon, induerte sitagliptinbehandling en signifikant økning i CPGCR på  $22,6 \pm 26,8$  %, noe som understreker at sitagliptin fører til bedret  $\beta$ -cellefunksjon. Dette samsvarer også med resultater fra studier utført på pasienter med DMT2, hvor det ble vist at sitagliptin forbedret  $\beta$ -cellefunksjonen relativt til placebo [67, 97]. I en studie utført på pasienter med DMT2 som var utilstrekkelig kontrollert med metformin, viste Seck *et al.* at kombinasjon av sitagliptin førte til en bedre opprettholdelse av  $\beta$ -cellefunksjonen sammenlignet med kombinasjon av glipizid etter to års behandling [75]. Det er derfor tenkelig at sitagliptin utøver samme effekt i pasienter med NODAT.

### ***Insulinsensitivitet***

Insulinsensitiviteten i pasienter med NODAT ligger på rundt 60 % av den hos uberørte pasienter [2]. Sitagliptinbehandling førte til en ikke-signifikant gjennomsnittlig økning i  $ISI_{TX}$  på  $119 \pm 665$  %. Et ikke-signifikant resultat var naturlig med tanke på virkningsmekanismen til sitagliptin, da økt biologisk aktivitet av inkretinhormoner bedrer funksjonen til pankreatiske  $\beta$ -celler fremfor bedring av perifer insulinsresistens [98].

## **4.3 Mikrovaskulær endotelfunksjon**

Mikrovaskulær endotelfunksjon ble undersøkt ved å stimulere endotelavhengig vasodilatasjon i arteriolene i underarmen med transdermal iontoforetisk administrasjon av acetylkolin (ACh), målt ved hjelp av Laser-Doppler flowmetri (LDF). Total mikrovaskulær endotelfunksjon ble estimert med postokklusiv reaktiv hyperemitest (PORH).

Fordelene med metoden er at den er ikke-invasiv, i tillegg til at LDF gir et konstant mål på blodflow (AU x min) i måleområdet [45]. Måling av endotelavhengig vasodilasjon i arteriolene (rett før kapillærene) i underarmen, gir dessuten et mer relevant mål for de minste karene i sirkulasjonen, enn måling på brakialarterien i overarmen (personlig kommunikasjon, Anders Åsberg). Metoden har imidlertid også begrensninger. For det første har metoden en høy variasjonskoeffisient, og gjennomsnittlig dag til dag variasjonskoeffisient for respons på ACh har blitt målt til å være 34,4 – 42,0 % for LDF [45]. For det andre kan flere faktorer som romtemperatur, hudtemperatur, kaffe (vasodilasjon) og tobakk (vasokonstriksjon) samt bevegelse i arm og fingre påvirke resultatene. Det er derfor viktig at alle faktorer som kan påvirke vasoaktiviteten holdes konstant under undersøkelsene [45]. Mikrovaskulær endotelfunksjon ble undersøkt under relativt like forhold ved alle tre undersøkelsesdagene. Undersøkelsene startet etter at OGTT var gjennomført, og pasientene hadde inntatt frokost og morgendosen med medisiner. Pasientene lå i en seng under hele undersøkelsen, og kom til ro før oppstart. Både hud - og romtemperaturen ble monitorert, og endringene var ubetydelige. Bevegelse i arm og fingre ble tatt hensyn til ved avlesning av resultatene.

Resultatene viser store interindividuelle forskjeller i endotelfunksjon. Sitagliptinbehandling førte ikke til noen relevante effekter på endotelfunksjonen, verken på acetylkolin - mediert funksjon ( $AUC_{ACh}$ ) eller total mikrovaskulær endotelfunksjon ( $AUC_{Rh}$ ). I en studie utført på nyretransplanterte pasienter med NODAT ved OUS Rikshospitalet, viste Voytovich *et al.* at fire ukers behandling med rosiglitason førte til signifikant bedret mikrovaskulær endotelfunksjon ( $AUC_{ACh}$  fra 389 til 832 AU x min,  $p=0,04$ ) [99]. Tidligere studier har også vist at bedret glukosemetabolisme fører til bedret endotelfunksjonen, uavhengig av glukosesenkende behandling [100]. Denne sammenhengen kunne ikke påvises i denne studien, da endotelfunksjonen ikke endret seg i betydelig grad på tross av signifikant høyere 1.- og 2.fase-insulinsekresjon samt signifikant lavere fastende og postprandiale glukosekonsentrasjoner. Resultatene fra denne studien tyder derfor på at Voytovich *et al.* sin observasjon skyldtes pleiotrop effekt av rosiglitason, og ikke blodsukkerreduksjonen i seg selv. Ved endoteldysfunksjon vil blodperfusjonen til perifere muskler begrenses, og dette kan potensielt føre til begrenset utnyttelse av glukose i muskulaturen. Denne sammenhengen er vist i en tidligere studie, hvor det ble funnet en signifikant assosiasjon mellom endoteldysfunksjon og insulinresistens i nyretransplanterte pasienter [31]. Det er derfor naturlig at sitagliptinbehandling ikke hadde signifikant effekt på insulinsensitivitet, da det ikke ble observert relevante effekter av sitagliptin på endotelfunksjon.

## 4.4 Sikkerhet og toleranse

### *Bivirkninger*

Sitagliptin var godt tolerert under studien. Dette samsvarer med studier utført på pasienter med DMT2, hvor sikkerhet og effekt av sitagliptin er undersøkt både som monoterapi [62] og kombinasjonsterapi med andre antidiabetika [61, 75]. En pasient opplevde nattesvette uten at dette skyldtes hypoglykemi, og denne pasienten var den eneste som ble ekskludert fra studien grunnet symptomer som kunne relateres til sitagliptinbehandling. En annen pasient som fortsatte bruken av sitagliptin etter at studien var avsluttet, måtte seponere behandlingen grunnet uttalt kvalme med sviktende matinntak. Gastrointestinale plager som kvalme er tidligere erfart ved bruk av sitagliptin i kliniske studier [69]. Ingen av de andre pasientene opplevde symptomer som kan relateres til sitagliptin.

Som nevnt ble det observert et lavt antall av hypoglykemiske episoder, og ingen av de tre pasientene som målte en blodglukose  $\leq 3.3$  mmol/L hadde gjentatte hypoglykemiske målinger.

### *Legemiddelinteraksjoner*

Sitagliptin elimineres hovedsakelig uforandret via nyrene, og CYP-systemet (hovedsakelig CYP 3A4) er lite delaktig i metabolismen av legemiddelet. Det foreligger ingen rapporter om at sitagliptin hemmer hepatisk legemiddelmetabolisme. Det er derfor lite sannsynlig med klinisk relevante legemiddelinteraksjoner [73], og det er hittil ikke rapportert noen legemiddelinteraksjoner med sitagliptin i kliniske studier [101]. Ingen signifikante forskjeller ble funnet for blodkonsentrasjonene av CsA, everolimus og mykofenolat under studien, men sitagliptinbehandling førte til en uventet signifikant gjennomsnittlig økning i blodkonsentrasjonen av Tac på  $34,8 \pm 24,9$  % relativt til kontrollperioden. Siden blodkonsentrasjonen av Tac forholdt seg relativt uforandret etter kontrollperioden sammenlignet med baseline, tyder dette på at den økte blodkonsentrasjonen av Tac var et resultat av en mulig legemiddelinteraksjon med sitagliptin. Både CsA og Tac metaboliseres av CYP 3A4 [7]. Blodkonsentrasjonen av CsA viste en numerisk ikke-signifikant gjennomsnittlig økning på  $8,9 \pm 27,2$  % relativt til kontrollperioden.

I denne studien ble kun "trough" konsentrasjoner av Tac målt. Det er derfor behov for fullkinetikkstudier for videre å vurdere sikkerhet med hensyn på eventuelle interaksjoner mellom sitagliptin og kalsineurinhemmerne tacrolimus og ciklosporin.

### ***Biokjemiske parametre i blod og urin***

En liten gjennomsnittlig økning i urinsyre samt en liten gjennomsnittlig reduksjon i alkalisk fosfatase ble observert etter sitagliptinbehandling. Disse endringene var ikke signifikante, og ble vurdert til ikke å være klinisk relevante. Sett bort ifra kreatinin og GFR (diskutert under), ble ingen betydningsfulle endringer observert for de andre biokjemiske parametrene i blod eller urin.

### ***Nyrefunksjon***

Det er anbefalt å justere sitagliptindosen til 50 mg daglig ved moderat nyresvikt [74], og denne anbefalingen ble fulgt i denne studien. Individuell nyrefunksjon ble målt på bakgrunn av estimert kreatinin clearance, som gir et mål på glomerulær filtrasjonsrate (GFR). Kun tre av pasientene hadde  $GFR < 50$  mL/min den dagen de skulle starte med behandling, og fikk dermed 50 mg sitagliptin daglig. Dosejusteringen virket fornuftig, og disse tre pasientene hadde tilsvarende glukosesenkende effekt som de resterende pasientene med  $GFR \geq 50$  mL/min, som fikk standarddosering på 100 mg daglig.

Sitagliptinbehandling førte til en signifikant gjennomsnittlig reduksjon i GFR (mL/min) på  $-3,9 \pm 6,8$  % relativt til kontrollperioden. Selv om denne reduksjonen ikke er av klinisk relevans, var dette et uventet resultat, siden oppfølgingstiden var relativt kort. De fem pasientene som benyttet Tac hadde generelt en større reduksjon i GFR ( $-6,7 \pm 6,6$  mL/min) etter perioden med sitagliptinbehandling enn de resterende pasientene ( $-2,0 \pm 4,4$  mL/min), og forskjellen mellom disse to gruppene tenderte til å være signifikant ( $p=0,07$ ). Den økte blodkonsentrasjon av Tac kan ha vært en medvirkende faktor for større reduksjon i GFR i Tac-gruppen, i og med at Tac er nefrotoksisk [3]. GFR ble beregnet ved hjelp av Cockcroft-Gault-ligningen. Denne er ikke godt validert for pasienter med relativt høy GFR, som flere av pasientene i denne studien hadde (personlig kommunikasjon, Trond Jenssen). Funnet er derfor usikkert, selv om det ble observert en numerisk ikke-signifikant økning også i kreatinin. Hovedproblemet med å analysere et stort antall markører, er at separate analyser på 5 % -nivå vil øke sannsynligheten for falske positive funn. Dersom det hadde blitt utført en Bonferroni-korreksjon av de biokjemiske markørene i blod og urin samt av blodkonsentrasjonen av immunsuppressiva (totalt  $n=24$ ), ville forandringen i GFR ikke blitt vurdert som signifikant ( $p=0,22$ ) [102]. Den observerte reduksjonen i GFR er imidlertid interessant, og det er behov for flere studier av lengre varighet for å undersøke sikkerhet av sitagliptin i større populasjoner med varierende grad av nyresvikt.

***Kroppsmål og blodtrykk***

Studien viste at sitagliptin utøver en vektøytral glukosesenkende effekt. Dette er i samsvar med resultater fra andre studier, selv om en studie viste at kombinasjon av sitagliptin med metformin førte til vekttap sammenlignet med vektøkning når sulfonylurea ble kombinert med metformin [75]. Sitagliptin førte til en ikke-signifikant, men moderat reduksjon i både systolisk og diastolisk blodtrykk relativt til kontrollperioden. Dette resultatet er i overensstemmelse med andre studier som har indikert at inkretinbaserte terapier (DPP-4-hemmere og GLP-1-agonister) forårsaker moderate reduksjoner i blodtrykk [103, 104]. Det er foreslått at reduisering av blodtrykk kan ha fordelaktige effekter for spesifikke kardiovaskulære hendelser som slag og hjertedød, i tillegg til forbedret transplantat- og pasientoverlevelse [2].

**4.5 Effekt av sitagliptin på kardiovaskulær risiko/ESRD**

Økt hepatisk produksjon av akutfaseproteinet C-reaktivt protein (CRP) er involvert i aterosklerose. Proinflammatoriske cytokiner (IL-1 $\beta$  og TNF- $\alpha$ ) frigjøres i respons på CRP, som videre induserer uttrykkelsen av adhesjonsmolekyl som VCAM-1 ("vascular cell adhesion molecule-1"). Kontinuerlig frigjøring av cytokiner av aktiverte endotelceller, opprettholder ikke bare inflammasjon og lipidakkumulering i åreveggen, men påvirker også glatte muskelceller, som fører til vasokonstriksjon [44, 48]. Det er i tillegg vist en sammenheng mellom lave plasmakonsentrasjoner av adiponectin og nedsatt endotelfunksjon i pasienter med hypertensjon, DMT2 samt i friske individer [54]. Sitagliptinbehandling førte til en gjennomsnittlig reduksjon av mikro-CRP på  $-3,3 \pm 63,3$  %, en gjennomsnittlig reduksjon av VCAM-1 på  $0,1 \pm 20,9$  %, samt en gjennomsnittlig økning av adiponectin på  $28,2 \pm 85,6$  % relativt til kontrollperioden. Ingen av disse endringene var imidlertid statistisk signifikante, og dette samsvarer med at det ikke ble observert relevante effekter på endotelfunksjon.

Niewczas *et al.* fant nylig en signifikant sammenheng mellom økte konsentrasjoner av sTNFR-1 og risikoen for å utvikle ESRD ("end stage renal disease") hos pasienter med DMT2 [57]. I denne studien førte sitagliptinbehandling til en signifikant gjennomsnittlig reduksjon av sTNFR-1 på  $-4,0 \pm 10,7$  % relativt til kontrollperioden. Dette kan indikere at sitagliptin kan utøve en mulig nyrebeskyttende effekt, ved å redusere risikoen for å utvikle ESRD. Det har blitt ansett som en mulig hypotese at forhøyede konsentrasjoner av sTNFR-1 bidrar direkte til nyreskade samt progressiv nedgang i nyrefunksjon, som kan resultere i

ESRD. Det er imidlertid behov for flere studier for å definere den presise rollen til sTNFR-1 i utviklingen av ESRD [57].

Det er igjen viktig å ta i betraktning at det ble analysert et stort antall markører i denne studien. Ved en eventuell Bonferroni-korreksjon ville effekten på sTNFR-1 ikke blitt vurdert som signifikant ( $p=0,17$ ). Det er derfor behov for flere studier av lengre varighet for å undersøke denne effekten nærmere.

## 4.6 Styrker og begrensninger

Kliniske studier skal ideelt sett være randomisert og blindet for å unngå ulike former for bias. Randomisering er som regel enkelt å gjennomføre, og i denne studien ble pasientene randomisert ved trekning, slik at det var tilfeldig hvilken studieperiode de startet med. Dette sikret en rettferdig sammenligning av de to studieperiodene og reduserte ”regression towards the mean”; det statistiske fenomenet om at variabler som er ekstreme ved første måling vil normalisere seg ved senere målinger. Blindede studier er imidlertid mer komplisert å få gjennomført, og det er generelt vanskelig å få tak i placebomedisin hvis man ikke utfører studier på oppdrag fra industrien [105]. Dette var en åpen kryss-over-studie, og en svakhet med studien var at kontrollperioden ikke var placebokontrollert.

Kryss-over-studier er på en annen side fordelaktige i og med at hver pasient er sin egen kontroll. Dette reduserer tilfeldig variasjon, siden variasjonen hos hver enkelt pasient over tid ofte vil være mindre enn variasjonen mellom individer [102]. Kryss-over-studie var et egnet design i denne studien av flere årsaker. For det første tillatter dette designet inklusjon av færre pasienter enn hva som er nødvendig ved parallellstudier. Dette var fordelaktig da det var vanskelig å finne pasienter som passet inklusjonskriteriene i løpet av den korte rekrutteringsperioden. For det andre er diabetes mellitus en stabil sykdom. Dette sikrer at resultatene i studien er forårsaket av sitagliptin og ikke tilfeldige endringer i sykdomsforløpet.

De inkluderte studiedeltakerene var som nevnt generelt moderat hyperglykemiske. Det er sannsynlig ut fra tidligere studier på pasienter med DMT2, at en større relativ effekt av sitagliptin ville blitt observert dersom pasientene hadde vært mer hyperglykemiske. En må også tenke på at dette var en relativt liten studie, både med tanke på varighet og antall pasienter. Det er derfor behov for flere studier for å undersøke effekten av sitagliptin ved lengre behandlingsperioder i et større utvalg pasienter.



## 5 Konklusjon

Dette er den første studien hvor sitagliptin utprøves på pasienter som har utviklet diabetes/glukoseintoleranse etter nyretransplantasjon. Peroral administrering av sitagliptin én gang daglig resulterte i klinisk relevante og statistisk signifikante reduksjoner i både fastende og postprandial blodglukose gjennom hele døgnet. Dette viser at sitagliptin representerer et verdifullt behandlingsalternativ for denne type pasienter som ikke har behov for insulinbehandling. Bedret glykemisk kontroll med sitagliptin kan potensielt bedre langtidsoverlevelsen etter nyretransplantasjon, uavhengig av andre faktorer, ved å redusere risikoen for kardiovaskulær sykdom og tidlig død. Om forbedringen av  $\beta$ -cellefunksjonen kan overføres til bedre utfall av NODAT ved lengre behandlingsperioder, gjenstår å undersøkes. Studien viste ikke relevante effekter av sitagliptin verken på endotelfunksjon eller plasmamarkører for kardiovaskulær risiko.

Det er behov for fullkinetikkstudier for videre å vurdere sikkerhet med hensyn på eventuelle interaksjoner mellom sitagliptin og kalsineurinhemmerne tacrolimus og ciklosporin. Om reduksjonen av sTNFR-1 kan ha en mulig nyrebeskyttende effekt ved lengre behandlingsperioder, gjenstår å undersøkes.

---

# Litteraturliste

1. Stevens, K.K., Patel, R.K., and Jardine, A.G., *How to identify and manage diabetes mellitus after renal transplantation*. J Ren Care, 2012. **38 Suppl 1**: p. 125-37.
2. Jardine, A.G., Gaston, R.S., Fellstrom, B.C., and Holdaas, H., *Prevention of cardiovascular disease in adult recipients of kidney transplants*. Lancet, 2011. **378**(9800): p. 1419-27.
3. Hartmann, A., Jenssen, T., and Julsrud, J., *Nyremedisin - en praktisk veileder*. 2 ed. 2008: Gyldendal Norsk Forlag AS.
4. Leivestad, T. *ANNUAL REPORT 2010, The Norwegian Renal Registry*. 2010 [cited 2011 21.11.]; Available from: <http://www.nephro.no/nnr/AARSMEL2010.pdf>.
5. Bakkan, P.A., *Årsrapport.Organdonasjon og transplantasjon 1. januar - 31. desember 2011*. 2011: Oslo universitetssykehus.
6. Vethe, N.T., Midtvedt, K., Åsberg, A., Amundsen, R., and Bergan, S., *Legemiddelinteraksjoner og immunsuppresjon hos organtransplanterte*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2011. **20**(131): p. 2000-2003.
7. Kaposztas, Z., Gyurus, E., and Kahan, B.D., *New-onset diabetes after renal transplantation: diagnosis, incidence, risk factors, impact on outcomes, and novel implications*. Transplant Proc, 2011. **43**(5): p. 1375-94.
8. Boerner, B.P., Shivaswamy, V., Desouza, C.V., and Larsen, J.L., *Diabetes and cardiovascular disease following kidney transplantation*. Curr Diabetes Rev, 2011. **7**(4): p. 221-34.
9. Pham, P.T., Pham, P.M., Pham, S.V., Pham, P.A., and Pham, P.C., *New onset diabetes after transplantation (NODAT): an overview*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2011. **4**: p. 175-86.
10. Aasebo, W., Midtvedt, K., Valderhaug, T.G., Leivestad, T., Hartmann, A., Reisaeter, A.V., Jenssen, T., and Holdaas, H., *Impaired glucose homeostasis in renal transplant recipients receiving basiliximab*. Nephrol Dial Transplant, 2010. **25**(4): p. 1289-93.
11. Wilkinson, A., Davidson, J., Dotta, F., Home, P.D., Keown, P., Kiberd, B., Jardine, A., Levitt, N., Marchetti, P., Markell, M., Naicker, S., O'Connell, P., Schnitzler, M., Standl, E., Torregosa, J.V., Uchida, K., Valantine, H., Villamil, F., Vincenti, F., and Wissing, M., *Guidelines for the treatment and management of new-onset diabetes after transplantation*. Clin Transplant, 2005. **19**(3): p. 291-8.
12. *Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia. Report of a WHO/IDF Consultation*. 2006, World Health Organization. p. 50.
13. *Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Abbreviated Report of a WHO Consultation*. 2011, World Health Organization. p. 25.
14. Agarwal, R. and Light, R.P., *Relationship between glycosylated hemoglobin and blood glucose during progression of chronic kidney disease*. Am J Nephrol, 2011. **34**(1): p. 32-41.
15. Jenssen, T. and Hartmann, A., *Prevention and management of transplant-associated diabetes*. Expert Opin Pharmacother, 2011. **12**(17): p. 2641-55.
16. Hjelmessaeth, J., Asberg, A., Muller, F., Hartmann, A., and Jenssen, T., *New-onset posttransplantation diabetes mellitus: insulin resistance or insulinopenia? Impact of immunosuppressive drugs, cytomegalovirus and hepatitis C virus infection*. Curr Diabetes Rev, 2005. **1**(1): p. 1-10.
17. Yates, C.J., Fournanos, S., Hjelmessaeth, J., Colman, P.G., and Cohnsey, S.J., *New-Onset Diabetes After Kidney Transplantation-Changes and Challenges*. Am J Transplant, 2011.

18. Valderhaug, T.G., Hjelmesaeth, J., Rollag, H., Leivestad, T., Roislien, J., Jenssen, T., and Hartmann, A., *Reduced incidence of new-onset posttransplantation diabetes mellitus during the last decade*. Transplantation, 2007. **84**(9): p. 1125-30.
19. Meier, J.J., Ueberberg, S., Korbas, S., and Schneider, S., *Diminished glucagon suppression after beta-cell reduction is due to impaired alpha-cell function rather than an expansion of alpha-cell mass*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2011. **300**(4): p. E717-23.
20. Kasiske, B.L., Snyder, J.J., Gilbertson, D., and Matas, A.J., *Diabetes mellitus after kidney transplantation in the United States*. Am J Transplant, 2003. **3**(2): p. 178-85.
21. Cosio, F.G., Pesavento, T.E., Osei, K., Henry, M.L., and Ferguson, R.M., *Post-transplant diabetes mellitus: increasing incidence in renal allograft recipients transplanted in recent years*. Kidney Int, 2001. **59**(2): p. 732-7.
22. Hamer, R.A., Chow, C.L., Ong, A.C., and McKane, W.S., *Polycystic kidney disease is a risk factor for new-onset diabetes after transplantation*. Transplantation, 2007. **83**(1): p. 36-40.
23. de Mattos, A.M., Olyaei, A.J., Prather, J.C., Golconda, M.S., Barry, J.M., and Norman, D.J., *Autosomal-dominant polycystic kidney disease as a risk factor for diabetes mellitus following renal transplantation*. Kidney Int, 2005. **67**(2): p. 714-20.
24. Pietrzak-Nowacka, M., Safranow, K., Rozanski, J., Debska-Slizien, A., Domanski, L., Dziewanowski, K., Glyda, M., Jankowska, M., Nocen, M., Pabisiak, K., Rutkowski, B., Wisniewska, M., and Ciechanowski, K., *Autosomal dominant polycystic kidney disease is not a risk factor for post-transplant diabetes mellitus. Matched-pair design multicenter study*. Arch Med Res, 2008. **39**(3): p. 312-9.
25. Ruderman, I., Masterson, R., Yates, C., Gorelik, A., Cohnsey, S.J., and Walker, R.G., *New onset diabetes after kidney transplantation in autosomal dominant polycystic kidney disease: a retrospective cohort study*. Nephrology (Carlton), 2012. **17**(1): p. 89-96.
26. Hjelmesaeth, J., Muller, F., Jenssen, T., Rollag, H., Sagedal, S., and Hartmann, A., *Is there a link between cytomegalovirus infection and new-onset posttransplantation diabetes mellitus? Potential mechanisms of virus induced beta-cell damage*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(11): p. 2311-5.
27. Morales, J.M., Bloom, R., and Roth, D., *Kidney transplantation in the patient with hepatitis C virus infection*. Contrib Nephrol, 2012. **176**: p. 77-86.
28. Kawaguchi, T., Taniguchi, E., Itou, M., Sakata, M., Sumie, S., and Sata, M., *Insulin resistance and chronic liver disease*. World J Hepatol, 2011. **3**(5): p. 99-107.
29. Van Laecke, S., Van Biesen, W., Verbeke, F., De Bacquer, D., Peeters, P., and Vanholder, R., *Posttransplantation hypomagnesemia and its relation with immunosuppression as predictors of new-onset diabetes after transplantation*. Am J Transplant, 2009. **9**(9): p. 2140-9.
30. Joss, N., Staats, C.E., Thomson, A.H., and Jardine, A.G., *Predictors of new onset diabetes after renal transplantation*. Clin Transplant, 2007. **21**(1): p. 136-43.
31. Voytovich, M.H., Asberg, A., Hjelmesaeth, J., Jenssen, T., and Hartmann, A., *Association between insulin resistance and endothelial dysfunction in renal transplant recipients*. Clin Transplant, 2006. **20**(2): p. 195-9.
32. Shah, T., Kasravi, A., Huang, E., Hayashi, R., Young, B., Cho, Y.W., and Bunnapradist, S., *Risk factors for development of new-onset diabetes mellitus after kidney transplantation*. Transplantation, 2006. **82**(12): p. 1673-6.
33. Hjelmesaeth, J., Hagen, L.T., Asberg, A., Midtvedt, K., Storset, O., Halvorsen, C.E., Morkrid, L., Hartmann, A., and Jenssen, T., *The impact of short-term ciclosporin A*

- treatment on insulin secretion and insulin sensitivity in man.* Nephrol Dial Transplant, 2007. **22**(6): p. 1743-9.
34. Hjelmessaeth, J., Hartmann, A., Kofstad, J., Stenstrom, J., Leivestad, T., Egeland, T., and Fauchald, P., *Glucose intolerance after renal transplantation depends upon prednisolone dose and recipient age.* Transplantation, 1997. **64**(7): p. 979-83.
35. Midtvedt, K., Hjelmessaeth, J., Hartmann, A., Lund, K., Paulsen, D., Egeland, T., and Jenssen, T., *Insulin resistance after renal transplantation: the effect of steroid dose reduction and withdrawal.* J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(12): p. 3233-9.
36. Bergrem, H.A., Bergrem, H., Hartmann, A., Hjelmessaeth, J., and Jenssen, T., *Role of prednisolone pharmacokinetics in postchallenge glycemia after renal transplantation.* Ther Drug Monit, 2008. **30**(5): p. 583-90.
37. Nathan, D.M., Buse, J.B., Davidson, M.B., Ferrannini, E., Holman, R.R., Sherwin, R., and Zinman, B., *Medical management of hyperglycaemia in type 2 diabetes mellitus: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy: a consensus statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes.* Diabetologia, 2009. **52**(1): p. 17-30.
38. Ismail-Beigi, F., *Clinical practice. Glycemic management of type 2 diabetes mellitus.* N Engl J Med, 2012. **366**(14): p. 1319-27.
39. Klachko, D. and Whaley-Connell, A., *Use of Metformin in Patients with Kidney and Cardiovascular Diseases.* Cardiorenal Med, 2011. **1**(2): p. 87-95.
40. Voytovich, M.H., Haukereid, C., Hjelmessaeth, J., Hartmann, A., Lovik, A., and Jenssen, T., *Nateglinide improves postprandial hyperglycemia and insulin secretion in renal transplant recipients.* Clin Transplant, 2007. **21**(2): p. 246-51.
41. Maamoun, H., Esmail, E., and Soliman, A., *Vascular endothelial function of sirolimus maintenance regimen in renal transplant recipients.* Transplant Proc, 2011. **43**(5): p. 1616-8.
42. Sitia, S., Tomasoni, L., Atzeni, F., Ambrosio, G., Cordiano, C., Catapano, A., Tramontana, S., Perticone, F., Naccarato, P., Camici, P., Picano, E., Cortigiani, L., Bevilacqua, M., Milazzo, L., Cusi, D., Barlassina, C., Sarzi-Puttini, P., and Turiel, M., *From endothelial dysfunction to atherosclerosis.* Autoimmun Rev, 2010. **9**(12): p. 830-4.
43. Sommerschild, H.T., *Er infeksjon en patogenetisk faktor ved koronar hjertesykdom?* Tidsskrift for Den norske legeforening, 2000. **28**(120): p. 3396-3403.
44. Funk, S.D., Yurdagul, A., Jr., and Orr, A.W., *Hyperglycemia and endothelial dysfunction in atherosclerosis: lessons from type 1 diabetes.* Int J Vasc Med, 2012. **2012**: p. 569654.
45. Turner, J., Belch, J.J., and Khan, F., *Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis.* Trends Cardiovasc Med, 2008. **18**(4): p. 109-16.
46. Ozkurt, S., Sahin, G., Degirmenci, N.A., Temiz, G., Musmul, A., Tek, M., Birdane, A., Tekin, N., Akyuz, F., and Yalcin, A.U., *Late effects of renal transplantation on endothelial functions and cardiac morphology.* Transplant Proc, 2011. **43**(7): p. 2606-11.
47. Debbabi, H., Bonnin, P., Ducluzeau, P.H., Leftheriotis, G., and Levy, B.I., *Noninvasive assessment of endothelial function in the skin microcirculation.* Am J Hypertens, 2010. **23**(5): p. 541-6.
48. Zhang, C., *The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction.* Basic Res Cardiol, 2008. **103**(5): p. 398-406.
49. Perticone, F., Sciacqua, A., Maio, R., Perticone, M., Galiano Leone, G., Bruni, R., Di Cello, S., Pascale, A., Talarico, G., Greco, L., Andreozzi, F., and Sesti, G.,

- Endothelial dysfunction, ADMA and insulin resistance in essential hypertension.* Int J Cardiol, 2010. **142**(3): p. 236-41.
50. Hills, C.E. and Brunskill, N.J., *Cellular and physiological effects of C-peptide.* Clin Sci (Lond), 2009. **116**(7): p. 565-74.
51. Usarek, M. and Bryla, J., *Pleiotropic action of proinsulin C-peptid.* Postepy Hig Med Dosw (Online), 2012. **66**: p. 135-45.
52. Haidet, J., Cifarelli, V., Trucco, M., and Luppi, P., *C-peptide reduces pro-inflammatory cytokine secretion in LPS-stimulated U937 monocytes in condition of hyperglycemia.* Inflamm Res, 2012. **61**(1): p. 27-35.
53. Wolfson, N., Gavish, D., Matas, Z., Boaz, M., and Shargorodsky, M., *Relation of adiponectin to glucose tolerance status, adiposity, and cardiovascular risk factor load.* Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 250621.
54. Li, H., Xiao, Y., Liu, H., Chen, X.Y., Li, X.Y., Tang, W.L., Liu, S.P., Xu, A.M., and Zhou, Z.G., *Hypoadiponectinemia predicts impaired endothelium-independent vasodilation in newly diagnosed type 2 diabetic patients: an 8-year prospective study.* Chin Med J (Engl), 2011. **124**(22): p. 3607-12.
55. Butt, N., Kuiper, K.K.-J., and Nordrehaug, J.E., *Moderne behandling av akutt hjerteinfarkt uten ST-elevasjon.* Tidsskrift for Den norske legeforening, 2004. **5**(124): p. 644-647.
56. Rask-Madsen, C., Dominguez, H., Ihlemann, N., Hermann, T., Kober, L., and Torp-Pedersen, C., *Tumor necrosis factor-alpha inhibits insulin's stimulating effect on glucose uptake and endothelium-dependent vasodilation in humans.* Circulation, 2003. **108**(15): p. 1815-21.
57. Niewczas, M.A., Gohda, T., Skupien, J., Smiles, A.M., Walker, W.H., Rosetti, F., Cullere, X., Eckfeldt, J.H., Doria, A., Mayadas, T.N., Warram, J.H., and Krolewski, A.S., *Circulating TNF receptors 1 and 2 predict ESRD in type 2 diabetes.* J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(3): p. 507-15.
58. Arora, S., Gunther, A., Wennerblom, B., Ueland, T., Andreassen, A.K., Gude, E., Endresen, K., Geiran, O., Wilhelmsen, N., Andersen, R., Aukrust, P., and Gullestad, L., *Systemic markers of inflammation are associated with cardiac allograft vasculopathy and an increased intimal inflammatory component.* Am J Transplant, 2010. **10**(6): p. 1428-36.
59. Weis, M. and von Scheidt, W., *Cardiac allograft vasculopathy: a review.* Circulation, 1997. **96**(6): p. 2069-77.
60. Saxena, M., Agrawal, C.G., Bid, H.K., and Banerjee, M., *An Interleukin-10 Gene Promoter Polymorphism (-592A/C) Associated with Type 2 Diabetes: A North Indian Study.* Biochem Genet, 2012.
61. Scheen, A.J., *A review of gliptins in 2011.* Expert Opin Pharmacother, 2012. **13**(1): p. 81-99.
62. Raz, I., Hanefeld, M., Xu, L., Caria, C., Williams-Herman, D., and Khatami, H., *Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus.* Diabetologia, 2006. **49**(11): p. 2564-71.
63. Kase, E.T. and Birkeland, K.I., *Antidiabetika som påvirker inkretinsystemet.* Tidsskrift for Den norske legeforening, 2008. **4**(128): p. 440-442.
64. Chrysant, S.G. and Chrysant, G.S., *Clinical Implications of Cardiovascular Preventing Pleiotropic Effects of Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitors.* Am J Cardiol, 2012.
65. Kazafeos, K., *Incretin effect: GLP-1, GIP, DPP4.* Diabetes Res Clin Pract, 2011. **93** Suppl 1: p. S32-6.

66. Hansen, K.B., Vilsboll, T., Bagger, J.I., Holst, J.J., and Knop, F.K., *Impaired incretin-induced amplification of insulin secretion after glucose homeostatic dysregulation in healthy subjects*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(4): p. 1363-70.
67. Williams-Herman, D., Xu, L., Teng, R., Golm, G.T., Johnson, J., Davies, M.J., Kaufman, K.D., and Goldstein, B.J., *Effect of initial combination therapy with sitagliptin and metformin on beta-cell function in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Obes Metab, 2012. **14**(1): p. 67-76.
68. Sangle, G.V., Lauffer, L.M., Grieco, A., Trivedi, S., Iakoubov, R., and Brubaker, P.L., *Novel biological action of the dipeptidylpeptidase-IV inhibitor, sitagliptin, as a glucagon-like peptide-1 secretagogue*. Endocrinology, 2012. **153**(2): p. 564-73.
69. Richard, K.R., Shelburne, J.S., and Kirk, J.K., *Tolerability of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: a review*. Clin Ther, 2011. **33**(11): p. 1609-29.
70. Fadini, G.P. and Avogaro, A., *Cardiovascular effects of DPP-4 inhibition: beyond GLP-1*. Vascu Pharmacol, 2011. **55**(1-3): p. 10-6.
71. Scheen, A.J., *Pharmacokinetics of dipeptidylpeptidase-4 inhibitors*. Diabetes Obes Metab, 2010. **12**(8): p. 648-58.
72. Neumiller, J.J., *Clinical pharmacology of incretin therapies for type 2 diabetes mellitus: implications for treatment*. Clin Ther, 2011. **33**(5): p. 528-76.
73. Scheen, A.J., *Pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of sitagliptin plus metformin*. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2010. **6**(10): p. 1265-76.
74. Bergman, A.J., Cote, J., Yi, B., Marbury, T., Swan, S.K., Smith, W., Gottesdiener, K., Wagner, J., and Herman, G.A., *Effect of renal insufficiency on the pharmacokinetics of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor*. Diabetes Care, 2007. **30**(7): p. 1862-4.
75. Seck, T., Nauck, M., Sheng, D., Sunga, S., Davies, M.J., Stein, P.P., Kaufman, K.D., and Amatruda, J.M., *Safety and efficacy of treatment with sitagliptin or glipizide in patients with type 2 diabetes inadequately controlled on metformin: a 2-year study*. Int J Clin Pract, 2010. **64**(5): p. 562-76.
76. Elashoff, M., Matveyenko, A.V., Gier, B., Elashoff, R., and Butler, P.C., *Pancreatitis, pancreatic, and thyroid cancer with glucagon-like peptide-1-based therapies*. Gastroenterology, 2011. **141**(1): p. 150-6.
77. Monami, M., Dicembrini, I., Martelli, D., and Mannucci, E., *Safety of dipeptidyl peptidase-4 inhibitors: a meta-analysis of randomized clinical trials*. Curr Med Res Opin, 2011. **27 Suppl 3**: p. 57-64.
78. Williams-Herman, D., Engel, S.S., Round, E., Johnson, J., Golm, G.T., Guo, H., Musser, B.J., Davies, M.J., Kaufman, K.D., and Goldstein, B.J., *Safety and tolerability of sitagliptin in clinical studies: a pooled analysis of data from 10,246 patients with type 2 diabetes*. BMC Endocr Disord, 2010. **10**: p. 7.
79. *TECOS Study, Diabetes Trials Unit*. 2008 [cited 2012 13.05.]; Available from: <http://www.dtu.ox.ac.uk/tecos/index.php>.
80. Murohara, T., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor: another player for cardiovascular protection*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(3): p. 277-9.
81. Matsubara, J., Sugiyama, S., Sugamura, K., Nakamura, T., Fujiwara, Y., Akiyama, E., Kurokawa, H., Nozaki, T., Ohba, K., Konishi, M., Maeda, H., Izumiya, Y., Kaikita, K., Sumida, H., Jinnouchi, H., Matsui, K., Kim-Mitsuyama, S., Takeya, M., and Ogawa, H., *A dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, des-fluoro-sitagliptin, improves endothelial function and reduces atherosclerotic lesion formation in apolipoprotein E-deficient mice*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(3): p. 265-76.

82. Asberg, A., Holm, T., Vassbotn, T., Andreassen, A.K., and Hartmann, A., *Nonspecific microvascular vasodilation during iontophoresis is attenuated by application of hyperosmolar saline*. Microvasc Res, 1999. **58**(1): p. 41-8.
83. Cracowski, J.L., Minson, C.T., Salvat-Melis, M., and Halliwill, J.R., *Methodological issues in the assessment of skin microvascular endothelial function in humans*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(9): p. 503-8.
84. Høvik, H.K. *Langtidsresultater etter kombinert nyre-pankreas- og nyretransplantasjon hos personer med type 1-diabetes: En pilotstudie (Universitetet i Oslo)*. 2007; Available from: <http://www.duo.uio.no/>.
85. Faradji, R.N., Monroy, K., Messinger, S., Pileggi, A., Froud, T., Baidal, D.A., Cure, P.E., Ricordi, C., Luzi, L., and Alejandro, R., *Simple measures to monitor beta-cell mass and assess islet graft dysfunction*. Am J Transplant, 2007. **7**(2): p. 303-8.
86. *SI Unit Conversion Calculator*. 14.12.2011 [cited 2012 13.04.]; Available from: [http://www.soc-bdr.org/rds/authors/unit\\_tables\\_conversions\\_and\\_genetic\\_dictionaries/e5196/index\\_en.html](http://www.soc-bdr.org/rds/authors/unit_tables_conversions_and_genetic_dictionaries/e5196/index_en.html).
87. Stumvoll, M., Mitrakou, A., Pimenta, W., Jenssen, T., Yki-Jarvinen, H., Van Haeften, T., Renn, W., and Gerich, J., *Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity*. Diabetes Care, 2000. **23**(3): p. 295-301.
88. Hjelmesaeth, J., Midtvedt, K., Jenssen, T., and Hartmann, A., *Insulin resistance after renal transplantation: impact of immunosuppressive and antihypertensive therapy*. Diabetes Care, 2001. **24**(12): p. 2121-6.
89. Cockcroft, D.W. and Gault, M.H., *Prediction of creatinine clearance from serum creatinine*. Nephron, 1976. **16**(1): p. 31-41.
90. Vik, K. *Effekter på insulinsekresjon og endotelfunksjon av Januvia® (DPP- IV hemmer) hos diabetiske nyretransplanterte pasienter (Universitetet i Oslo)*. 2010; Available from: <http://www.duo.uio.no/>.
91. Lindbæk, M. and Skovlund, E., *Kontrollerte kliniske forsøk - jakten på sann effekt av behandling*. Tidsskrift for Den norske legeforening, 2002. **27**(122): p. 2631-2635.
92. Fadem, S.Z. *Cockcroft-Gault kalkulator*. [cited 2012 05.05.]; Available from: <http://nephron.com/cgi-bin/CGSI.cgi>.
93. Valderhaug, T.G., Hjelmesaeth, J., Hartmann, A., Roislien, J., Bergrem, H.A., Leivestad, T., Line, P.D., and Jenssen, T., *The association of early post-transplant glucose levels with long-term mortality*. Diabetologia, 2011. **54**(6): p. 1341-9.
94. *KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients*. Am J Transplant, 2009. **9 Suppl 3**: p. S1-155.
95. Monami, M., Iacomelli, I., Marchionni, N., and Mannucci, E., *Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes: a meta-analysis of randomized clinical trials*. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2010. **20**(4): p. 224-35.
96. Lane, J.T., Odegaard, D.E., Haire, C.E., Collier, D.S., Wrenshall, L.E., and Stevens, R.B., *Sitagliptin therapy in kidney transplant recipients with new-onset diabetes after transplantation*. Transplantation, 2011. **92**(10): p. e56-7.
97. Xu, L., Man, C.D., Charbonnel, B., Meninger, G., Davies, M.J., Williams-Herman, D., Cobelli, C., and Stein, P.P., *Effect of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, on beta-cell function in patients with type 2 diabetes: a model-based approach*. Diabetes Obes Metab, 2008. **10**(12): p. 1212-20.
98. Deacon, C.F., Mannucci, E., and Ahren, B., *Glycaemic efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors as add-on therapy to metformin in subjects with type 2 diabetes-a review and meta analysis*. Diabetes Obes Metab, 2012.



99. Voytovich, M.H., Simonsen, C., Jenssen, T., Hjelmessaeth, J., Asberg, A., and Hartmann, A., *Short-term treatment with rosiglitazone improves glucose tolerance, insulin sensitivity and endothelial function in renal transplant recipients*. Nephrol Dial Transplant, 2005. **20**(2): p. 413-8.
100. Guerci, B., Bohme, P., Kearney-Schwartz, A., Zannad, F., and Drouin, P., *Endothelial dysfunction and type 2 diabetes. Part 2: altered endothelial function and the effects of treatments in type 2 diabetes mellitus*. Diabetes Metab, 2001. **27**(4 Pt 1): p. 436-47.
101. Scheen, A.J., *Dipeptidylpeptidase-4 inhibitors (gliptins): focus on drug-drug interactions*. Clin Pharmacokinet, 2010. **49**(9): p. 573-88.
102. Laake, P., Olsen, B.R., and Benestad, H.B., *Forskning i medisin og biofag*. 2 ed. Vol. 1. 2008: Gyldendal Norsk Forlag AS.
103. McGill, J.B., *Liraglutide: effects beyond glycaemic control in diabetes treatment*. Int J Clin Pract Suppl, 2010(167): p. 28-34.
104. Giorgino, F., Leonardini, A., Natalicchio, A., and Laviola, L., *Multifactorial intervention in Type 2 diabetes: the promise of incretin-based therapies*. J Endocrinol Invest, 2011. **34**(1): p. 69-77.
105. Åsberg, A. and Bergan, S., *Kliniske studier på organtransplanterte pasienter - eksempler på utprøverinitiert forskning*. Norsk Farmaceutisk Tidsskrift, 2010. **12**: p. 20-23.

# Appendiks A: Studien

## AI: Studieprotokoll (pilotstudie)

Version 4, 2. September 2008

### **The effect of sitagliptin treatment on glucose metabolism and endothelial function in renal transplant recipients**

—

#### **JANUVIA-08**

##### **Responsible investigator:**

Trond Jenssen, Professor MD, Ph.D., Medical Department, Rikshospitalet Medical Center.

##### **Co-investigators:**

Karen Helga Vik, Master grade student (Pharm), Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Anders Hartmann, Professor, MD, Ph.D., Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center.

Anders Åsberg, Professor, Ph.D., Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

### **Background:**

Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center is one of the 10 biggest transplant centers in the world. Between 220 and 265 kidney transplants are performed annually and the transplant pool consist of about 2500- 3000 patients in Norway. At present the most challenging task to further improve long-term results in these patients is the increasing cardiovascular morbidity and mortality. A renal transplant patient 30 years of age has approximately the same cardiovascular risk as a 70 years old person in the general population [1]. It has previously been shown that these patients suffer from hypertension, impaired glucose tolerance(IGT)/post transplant diabetes mellitus (PTDM), dyslipidemia as well as endothelial dysfunction [2-8].

Sitagliptin is a dipeptidylpeptidase 4-inhibitor (DPP-4 inhibitor) and increases the levels of the incretin hormones glukagon like peptid-1 (GLP-1) and glucose dependent insulinotropic peptid (GIP) since these hormones are hydrolyzed by DPP-4 [9]. The incretin hormones, which is released from the intestinal tract during a meal, regulates the glucose metabolism by increasing the insulin release from beta cells (elevated sensitivity of the beta cells towards glucose) and decreasing glucagon release from alpha cells. This effect seems to be dependent of increased plasma glucose and it is hence decreased risk for hypoglycemia by using drugs that alters the incretin system [9]. Sitagliptin is metabolized both via CYP3A4 as well as CYP2C8 but has not been shown to be an inhibitor of CYP enzymes [10]. Calcineurin inhibitors (cyclosporine, CsA and tacrolimus, Tac) are the corner stones in immunosuppressive regimens around the world. Both CsA and Tac are also metabolized via CYP3A4 and in a small single dose study it has been shown that CsA increases the plasma concentration of sitagliptin slightly [11]. Interaction the other way around is not suspected based on *in vitro* metabolism data.

### **Ethical considerations:**

Renal transplant recipients die prematurely due to cardiovascular disease. A 30 year old transplant recipient has approximately the same cardiovascular risk as a 70 year old person in the general population. It is therefore important to further elucidate on these problems, trying to prevent the development of cardiovascular disease as far as possible.

There are several underlying reasons for increased cardiovascular disease following renal transplantation, including diabetes mellitus, and in this study we primarily intend to investigate the effect of treatment with sitagliptin on insulin secretion/sensitivity as well as endothelial function, which both are major risk factors. Renal transplant recipients are treated with life-long immunosuppressive therapy in order to prevent acute rejection episodes. The calcineurin inhibitors (CsA and Tac) are the back-bones in the immunosuppressive treatment and they have a very narrow therapeutic index. It is therefore essential to assure that new drug to be used in transplanted patients do not interact with CsA and Tac. Oral hypoglycemic drugs that have been documented to be safe in combination with these for transplanted patients necessary drugs are glipizide [12], nateglinide [13] and rosiglitazone [14]. Metformin therapy involves the risk of lactic acidosis in patients with reduced renal function and is not used in renal transplant recipients. Even though sitagliptin is metabolized via the same enzyme as CsA and Tac (CYP3A4) previous *in vitro* and *in vivo* studies with relevant probe drugs in healthy volunteers do not indicate the presence of any relevant pharmacokinetic interaction. However, to be absolutely sure that it is safe to administer sitagliptin in transplanted patients blood concentrations of both CsA and Tac will be followed closely during the study.

**Rationale**

The major cause of premature death in renal transplant recipients is cardiovascular disease. Sitagliptin stimulates insulin secretion and inhibits glucagon release, two central mechanisms in PTDM by interaction with a hormone system (incretins) that just recently it has become possible to modulate by drugs. Sitagliptin therefore is an interesting additional drug for the treatment of PTDM in transplanted patients. Present *in vitro* and single dose *in vivo* data also show that sitagliptin does not interact with essential immunosuppressive drugs (CsA and Tac) indicating that it most probably is safe to administer to this patient population.

**Study objectives:**

The primary objective of the present study is to investigate the effect of sitagliptin on insulin secretion in renal transplant recipients.

Secondary objectives are;

- effect on insulin sensitivity
- effect on fasting blood glucose (measured daily at home)
- effect on endothelial function
- effect on CsA/Tac blood concentrations

**Study design:**

This is a prospective, open, randomized, controlled, cross-over study. Eligible renal transplant recipients are randomized to either first receive 100 mg sitagliptin per day for 4 weeks followed by a new period of 4 weeks with no treatment or the opposite sequence (no treatment followed by 100 mg sitagliptin). Patients with GFR 25-49 ml/min/1.73 m<sup>2</sup> will receive sitagliptin 50 mg/ day. Randomization envelopes will be prepared prior to the study by simple randomization and assigned to included patients consecutively. The randomization code will be kept in a closed envelope on the Laboratory for Renal Physiology, Rikshospitalet in order for the code to be broken in case of emergency. All patients should perform a pregnancy test prior to inclusion in the study. Baseline investigations of insulin secretion/sensitivity, and endothelial function will be performed prior to (but not more than 4 days prior to) first drug administration/no treatment period start. Patients are then treated with either sitagliptin or no treatment for periods of 4 weeks ( $\pm 4$  days), when the investigations performed at baseline will be repeated. The opposite treatment is then applied for 4 new weeks and the baseline investigations are repeated again after this period. Baseline investigations are not repeated before the second treatment phased. Prednisolone doses are not to be changed during the study. For safety reasons are four safety visits included in the study, one and two weeks after start of each treatment phase. On these visits glucose as well as CsA/Tac concentrations will be monitored and a general physical investigation performed.

### **Patients**

The patients will primarily be recruited from the great-Oslo area and all study visits will be performed at Rikshospitalet. Patients will otherwise follow standard posttransplant procedures at their local hospital during the study period. Patients included in other clinical trials are also eligible for inclusion the present study. In case of current antidiabetic treatment it should be continued without dose adjustments during the study. Informed consent will be obtained according to the Declaration of Helsinki and GCP. Patients and investigator will sign the patient information which will be kept on file. The patient will receive a copy of the patient information. The patient data will be recorded in Case Report Forms (CRF) and all information will be handled confidentially. Any complications will be recorded.

### **Inclusion criteria:**

- Renal transplant recipient more than 1 year posttransplant with stable renal function (less than 20% deviation in serum creatinine the last 2 months) and stable prednisolone dose for the last 3 months before inclusion.
- Patients in need of (additional) oral anti-diabetic treatment:
  - New onset diabetes patients with fasting plasma glucose 7-8 mmol/ l, and/or 2-hr plasma glucose 12-18 mmol/l after an oral glucose tolerance test (OGTT)
  - Patients already on oral hypoglycemic therapy, but with Hb<sub>A1c</sub> 8-11%
- > 18 years of age.
- Male patient, or female patient without childbearing potential (surgically sterilized or postmenopausal) or, if female of childbearing potential, is not lactating, has a negative pregnancy test at screening and is willing to utilize an effective method of contraception throughout the study period and for 90 Days following discontinuation of the Study Drugs.
- Signed informed consent.

### **Exclusion criteria:**

- Treatment with insulin
- Severe liver disease.

- Estimated GFR < 25 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>.
- Skin disorders that may influence laser Doppler flowmetry investigations.
- Pregnant or nursing mothers.

### **Study procedures**

*Oral glucose tolerance test (OGTT, for insulin secretion and sensitivity):*

Oral glucose tolerance test; measurements of plasma glucose and serum insulin before, 30 and 120 minutes following orally administration of 75 g glucose.

*The C-peptide to glucose, creatinine ratio:*

The C-peptide to glucose, creatinine ratio (CPGCR) will be determined from the fasting (basal) plasma glucose and c-peptide, and a simultaneous serum creatinine. This measure accounts for both the dependence of C-peptide secretion on the ambient glucose concentration and the dependence of C-peptide clearance on kidney function. The CPGCR is calculated as [c-peptide (nmol/L) \* 100]/ [glucose (mmol/L) \* creatinine (umol/L)].

*Plasma glucose concentrations:*

In addition to the plasma glucose concentrations measure at the OGTT investigations each patient will perform, and log, daily fasting plasma glucose concentrations.

*Hypoglycemic episodes:*

The participants will, on a daily basis, log the number and severity of hypoglycemic episodes.

*Endothelial function:*

The investigations will be performed by laser Doppler flowmetry in a quiet room at a constant temperature (22-25°C) as earlier described [15]. Patients with an AV-fistula are to be examined on the contralateral arm.

Patients are to be allowed acclimatisation for a period of 20 minutes. Subsequent monitoring of skin blood perfusion started with baseline measurements for 5 minutes,

followed by four consecutive 6 minutes periods after each charge given. The iontophoresis protocol consisted of; 0.50 mC (50  $\mu$ A for 10 seconds), 0.75 mC (75  $\mu$ A for 10 seconds), 1.0 mC (100  $\mu$ A for 10 seconds) and 1.5 mC (150  $\mu$ A for 10 seconds). A postocclusive reactive hyperemia test is to be performed following a new acclimatisation period of 5 minutes and 5 minutes baseline measurement. The forearm blood flow was occluded for 3 minutes with a suprasystolic cuff pressure of 280 mmHg, followed by instant release of the occlusion. A plasma sample (4 mL EDTA vacutainer) for the determination of NO concentrations will be drawn prior to the investigation.

*Calcineurin blood concentrations:*

Whole-blood and plasma samples (3 mL EDTA vacutainer tubes) for determination of whole-blood CsA (C2) or Tac (C0) concentration will be taken in according to standard procedures on the weekly visits.

*Clinical information*

Demographic data of the included patients should be registered in CRF's; age, height, weight, concomitant drugs and other potential cofactors that might affect the results. Any adverse events will also be recorded in the CRF and reported in according to guidelines. SUSARs will be reported in paper form on standard CIOMS-forms.

*Compliance*

Compliance issues are not expected in this patient population. However, compliance will be assured by tablet counting after each treatment phase.

*Laboratory methods:*

Plasma glucose concentrations are measured by a plasma calibrated HemocureAB™ B-glucose Analyser.

Serum insulin is analyzed in two parallels with Immulite Insulin kit on the Immulite 2000 platform.



Serum C-peptide is analyzed in two parallels with Immulite C-Peptide kit on the Immulite 2000 platform.

Total NO (nitric oxide) activity was determined as plasma nitrite and nitrate concentrations using a total NO assay (R&D Systems Europe Ltd., Abingdon, UK). All sample nitrate is enzymatically converted to nitrite by nitrate reductase followed by colorimetric nitrite determination of a colored azo dye product of the Griess reaction. CsA and Tac concentrations will be performed as standard analyses at the Department of Medical Biochemistry, Rikshospitalet.

#### *Withdrawals:*

Premature discontinuation of treatment will significantly lower the power of the study and patients should therefore attempt to remain on treatment unless there are compelling reasons for discontinuation.

Patients will be withdrawn from the study in case of potentially Study drug related adverse events (gastrointestinal, nasopharyngitis, severe hypoglycemia). Severe hypoglycemia is defined as plasma glucose < 2.0 mmol/L, unconsciousness or the need of assistance from other persons. Moderate hypoglycemia (plasma glucose between 2.0 and 3.9 mmol/L) will primarily result in dose reduction of the Study drug.

Patients are at all time free to express their wish to withdraw.

#### *Information to study personnel*

All involved study personnel will receive the full study protocol and they will in addition be informed on a start-up meeting about the study procedures. Any changes during the study will be distributed by the principal investigator via e-mail to all involved study personnel.

#### **Calculations**

Insulin sensitivity index for transplanted ( $ISI_{Tx}$ ) is calculated as  $ISI_{Tx} = 0.208 - 0.0032 * BMI - 0.0000645 * Ins_{120} - 0.00375 * Gluc_{120}$ .

Insulin secretion is estimated by the Stumvoll algorithms;  $Secr_{1,phase} = 1.283 + 1.829 * Ins_{30} - 138.7 * Gluc_{30} + 3.772 * Ins_0$  and  $Secr_{2,phase} = 287 + 0.4164 * Ins_{30} -$

$26.07 \cdot \text{Gluc}_{30} + 0.9226 \cdot \text{Ins}_0$  [Stumvoll M, Mitrakou A, Pimenta W, *et al.* Use of the oral glucose tolerance test to assess insulin release and insulin sensitivity. *Diabetes Care* 2000; 23: 295-301]

Endothelial function is to be estimated from two parameters, both the  $\text{AUC}_{\text{ACh}}$  and  $\text{AUC}_{\text{rh}}$  which is the area under the curve for 6 minutes following the 4<sup>th</sup> stimulation with acetylcholine (ACh) and until flux is back to baseline following the reactive hyperemia test, respectively [15].

### **Statistical considerations**

#### ***Number of patients***

Based on the assumption that sitagliptin induce a 25%  $\pm$ 20% larger change in insulin secretion during the 4 week of treatment as compared with no treatment [16, 17] ten patients are needed to assure a power of 80% at a 5% significance level. Four patients are added to the sample size to cover uncertainties in the calculations and possible drop-outs. In a total fourteen patients will be included.

*Formula for total sample-size calculation:*

$$n = \frac{2 \times SD^2}{(\mu_1 - \mu_2)^2} \times 7.9$$

#### ***Analysis plan:***

All metabolic parameters will be analysed as difference in change from baseline to the end of respective treatment period and the changes will be compared. Data are to be analysed with paired parametric statistical methods as long as they are normally distributed or can be converted to normal distribution by log, or other appropriate, transformation.

### Study drug

The study drug will be labeled with the following information (patients with  $\text{GFR} \geq 50$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>):

Til klinisk utprøvning	
JANUVIA-08 study	
Hovedutprøver: Professor Trond Jenssen, Rikshospitalet. Tlf: 23 07 00 00	
Pasient nr:	
Pasient initialer:	
Dato utlevert:	
Januvia <sup>®</sup> (sitagliptin) 100 mg tabletter	
1 tablett for frokost hver morgen.	
Utløpsdato:	Batchnummer:
Oppbevares i romtemperatur	
Oppbevares utilgjengelig for barn	

Patients with  $\text{GFR} 25-49$  ml/min/1.73m<sup>2</sup>:

Til klinisk utprøvning	
JANUVIA-08 study	
Hovedutprøver: Professor Trond Jenssen, Rikshospitalet. Tlf: 23 07 00 00	
Pasient nr:	
Pasient initialer:	
Dato utlevert:	
Januvia <sup>®</sup> (sitagliptin) 100 mg tabletter	
1/2 tablett før frokost hver morgen.	
Utløpsdato:	Batchnummer:
Oppbevares i romtemperatur	
Oppbevares utilgjengelig for barn	

Study drug administration will be performed in cooperation with the Pharmacy at Rikshospitalet.

**Study duration**

Each transplanted patient will be followed for 8 weeks.

First patient in: Q2 2008.

Anticipated recruitment time: 6 months.

Last patient out: Q1 2009

**Insurance**

The patients are insured according to Act of Product Responsibility.

## References

1. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis* 1998; 32:S112-119.
2. Hjeltnesaeth J, Hartmann A, Kofstad J, Stenstrom J, Leivestad T, Egeland T, Fauchald P. Glucose intolerance after renal transplantation depends upon prednisolone dose and recipient age. *Transplantation* 1997; 64:979-983.
3. Hjeltnesaeth J, Hartmann A, Leivestad T, Holdaas H, Sagedal S, Olstad M, Jenssen T. The impact of early-diagnosed new-onset post-transplantation diabetes mellitus on survival and major cardiac events. *Kidney Int* 2006; 69:588-595.
4. Hjeltnesaeth J, Midtvedt K, Jenssen T, Hartmann A. Insulin resistance after renal transplantation: impact of immunosuppressive and antihypertensive therapy. *Diabetes Care* 2001; 24:2121-2126.
5. Hausberg M, Kisters K, Kosch M, Rahn KH, Barenbrock M. Flow-mediated vasodilation and distensibility of the brachial artery in renal allograft recipients. *Kidney Int* 1999; 55:1104-1110.
6. Åsberg A, Berg KJ, Hartmann A. Each administration of cyclosporin A enhances skin microvascular reactivity in renal transplant recipients. *Microvasc Res* 2000; 60:81-90.
7. Midtvedt K, Hartmann A, Foss A, Fauchald P, Nordal KP, Rootwelt K, Holdaas H. Sustained improvement of renal graft function for two years in hypertensive renal transplant recipients treated with nifedipine as compared to lisinopril. *Transplantation* 2001; 72:1787-1792.

8. Holdaas H, Fellström B, Jardine AG, Holme I, Nyberg G, Fauchald P, Grönhagen-Riska C, Madsen S, Neumayer HH, Cole E, Maes B, Ambuhl P, Olsson AG, Hartmann A, Solbu DO, Pedersen TR. Effect of fluvastatin on cardiac outcomes in renal transplant recipients: a multicentre, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361:2024-2031.
9. McIntosh CH. Dipeptidyl peptidase IV inhibitors and diabetes therapy. *Front Biosci* 2008; 13:1753-1773.
10. Mistry GC, Bergman AJ, Luo WL, Cilissen C, Haazen W, Davies MJ, Gottesdiener KM, Wagner JA, Herman GA. Multiple-dose administration of sitagliptin, a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, does not alter the single-dose pharmacokinetics of rosiglitazone in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2007; 47:159-164.
11. Krishna R, Bergman A, Larson P, Cote J, Lasseter K, Dilzer S, Wang A, Zeng W, Chen L, Wagner J, Herman G. Effect of a single cyclosporine dose on the single-dose pharmacokinetics of sitagliptin (MK-0431), a dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in healthy male subjects. *J Clin Pharmacol* 2007; 47:165-174.
12. Sagedal S, Åsberg A, Hartmann A, Bergan S, Berg KJ. Glipizide treatment of post-transplant diabetes does not interfere with cyclosporine pharmacokinetics in renal allograft recipients. *Clin Transplant* 1998; 12:553-556.
13. Voytovich MH, Haukereid C, Hjeltnes J, Hartmann A, Løvik A, Jenssen T. Nateglinide improves postprandial hyperglycemia and insulin secretion in renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2007; 21:246-251.

14. Voytovich MH, Simonsen C, Jenssen T, Hjelmæsæth J, Åsberg A, Hartmann A. Short-term treatment with rosiglitazone improves glucose tolerance, insulin sensitivity and endothelial function in renal transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20:413-418.
15. Åsberg A, Hartmann A, Fjeldså E, Holdaas H. Atorvastatin improves endothelial function in renal-transplant recipients. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1920-1924.
16. Charbonnel B, Karasik A, Liu J, Wu M, Meininger G. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin added to ongoing metformin therapy in patients with type 2 diabetes inadequately controlled with metformin alone. *Diabetes Care* 2006; 29:2638-2643.
17. Raz I, Hanefeld M, Xu L, Caria C, Williams-Herman D, Khatami H. Efficacy and safety of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin as monotherapy in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetologia* 2006; 49:2564-2571.

## **AII: Endret studieprotokoll for den videre studien**

Amendment 1, version 1, 30. March 2011

### **AMENDMENT 1**

#### **The effect of sitagliptin treatment on glucose metabolism and endothelial function in renal transplant recipients**

—

#### **JANUVIA-08-Am1**

##### **Responsible investigator:**

Trond Jenssen, Professor MD, Ph.D, Medical Department, Rikshospitalet Medical Center.

##### **Co-investigators:**

Thea Anine Strøm Halden, Master grade student (Pharm), Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Karen Helga Vik, Master grade student (Pharm), Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

Anders Hartmann, Professor, MD, Ph.D., Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center.

Anders Åsberg, Professor, Ph.D., Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.



**New information:**

1. Recent research has shown that sitagliptin reduce the inflammatory response in *in vitro* models of renal ischemia [1]. This induced a positive effect on the preservation of renal function. Arora *et al* has also shown that systemic markers of inflammation are associated with negative cardiovascular effects in transplanted patients [2].
2. Twelve of the fourteen patients have been included and treated in the study so far. Only six patients have however provided complete evaluable results. More patients are hence needed to be included in the study in order to achieve enough evaluable patients according to the sample size calculations provided in the protocol.

**Amendment to the original study design:**

1. Plasma concentration of inflammatory markers such as interleukin-6, osteoprotegerin will be measured in baseline samples obtained at each investigation day. These analyses are to be performed in all patients included in the study.
2. In total 25 patients are to be included in the study in order to get enough evaluable patients for a power of 80% with a significance level of 5%.

**Ethical considerations:**

Sitagliptin treatment was well tolerated in the study so far and only one of the screened patients had to be withdrawn from the study due to possible side-effects (sweating at night) of the study drug.

The new analyses to be included in the study are similar to already measured parameters, like c-reactive peptide. So these additional analyses will not significantly change the study.

### **New additional study procedures**

#### *Plasma concentrations of inflammatory markers:*

Plasma concentrations of the potential inflammatory markers such as osteoprotegin, interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  will be analysed with commercially available ELISA-kits. Already stored as well as newly collected (and stored) plasma samples will be analyzed.

### **New study duration**

Each transplanted patient will be followed for 8 weeks.

First patient in: Q2 2008.

Last patient out: Q2 2012

### **Additional references**

1. Vaghasiya J, Sheth N, Bhalodia Y, Manek R. Sitagliptin protects renal ischemia reperfusion induced renal damage in diabetes. Regul Pept. 2011; 166(1-3): 48-54.
2. Arora S, Gunther A, Wennerblom B, Ueland T, Andreassen AK, Gude E, Endresen K, Geiran O, Wilhelmsen N, Andersen R, Aukrust P, Gullestad L. Systemic markers of inflammation are associated with cardiac allograft vasculopathy and an increased intimal inflammatory component. Am J Transplant. 2010; 10(6): 1428-36.

## AIII: Svar fra Regional komité for medisinsk og helsefaglig forskningsetikk



---

**Region:** REK sør-øst  
**Saksbehandler:** Emil Lahlum  
**Telefon:** 22845523

**Vår dato:** 20.06.2011  
**Vår referanse:** 2009/1679

**Deres dato:**  
**Deres referanse:** 2008-001442-45

Professor Trond Jenssen  
Rikshospitalet  
0027 Oslo

### **Effekten av sitagliptinbehandling på glukosemetabolisme og endotelfunksjon hos nyretransplanterte pasienter**

Vi viser til innsendt prosjektendringsskjema for overnevnte studie, mottatt xxx

Prosjektleder er Trond Jenssen

Forskningsansvarlig er Oslo universitetssykehus ved øverste administrative ledelse.

Endringen består i å øke antall deltakere til totalt 25 pasienter, samt inkludere måling av ulike ulike inflammatoriske markører i plasma.

#### **Vedtak:**

**Komiteen har vurdert endringssøknaden og godkjenner prosjektet slik det nå foreligger med hjemmel i helseforskningsloven § 11.**

Tillatelsen er gitt under forutsetning av at prosjektet gjennomføres slik det er beskrevet i søknaden, endringssøknad, oppdatert protokoll og de bestemmelser som følger av helseforskningsloven med forskrifter.

Dersom det skal gjøres ytterligere endringer i prosjektet i forhold til de opplysninger som er gitt i søknaden må prosjektleder sende endringsmelding til REK. Vi gjør oppmerksom på at hvis endringene er vesentlige må prosjektleder sende ny søknad, eller REK kan pålegge at dette gjøres.

Prosjektet skal sende sluttmelding til REK, jf. helseforskningsloven § 12.

For øvrig gjelder de vilkår som er satt i forbindelse med tidligere godkjenning av prosjektet.

---

**Postadresse:**  
Postboks 1130 Blindern  
0318 Oslo

**Telefon:** 22850548  
**E-post:** [post@helseforskning.etikkom.no](mailto:post@helseforskning.etikkom.no)  
**Web:** <http://helseforskning.etikkom.no>

Vi ber om at alle henvendelser sendes inn via vår saksportal eller på e-post. Vennligst oppgi vårt referansenummer i korrespondansen.



Vi ber om at alle henvendelser sendes inn via vår saksportal: <http://helseforskning.etikkom.no>  
eller på e-post til: [post@helseforskning.etikkom.no](mailto:post@helseforskning.etikkom.no).  
Vennligst oppgi vårt referansenummer i korrespondansen.

Med vennlig hilsen

Stein Evensen (sign.)  
professor dr. med.  
leder

Emil Lahlum  
Førstekonsulent

Kopi:  
Oslo universitetssykehus  
SLV

---

**Postadresse:**  
Postboks 1130 Blindern  
0318 Oslo

**Telefon:** 22850548  
**E-post:** [post@helseforskning.etikkom.no](mailto:post@helseforskning.etikkom.no)  
**Web:** <http://helseforskning.etikkom.no>

Vi ber om at alle henvendelser sendes  
inn via vår saksportal eller på e-post.  
Vennligst oppgi vårt referansenummer  
i korrespondansen.

## AIV: Pasientinformasjon og samtykkeerklæring

JANUVIA-08 – versjon nr. 3 – 30. mars 2011

### Forespørsel om deltakelse i legemiddelutprøving

#### *”Effekten av sitagliptinbehandling på glukosemetabolisme og endotelfunksjon hos nyretransplanterte pasienter”*

##### **Bakgrunn og hensikt**

Dette er en forespørsel til deg som er nyretransplantert om å delta i et forskningsprosjekt som innebærer utprøving av legemiddelet: sitagliptin (Januvia®). Mange nyretransplanterte pasienter utvikler diabetes etter transplantasjon, til dels på grunn av de immundempende legemidlene som brukes for å hindre at den nye nyren avstøtes. Sitagliptin er et nytt legemiddel som øker utskillelsen av insulin fra pankreas. Hensikten med denne studien er å undersøke hvordan sitagliptin virker hos nyretransplanterte pasienter som også bruker immundempende legemidler. Vi ønsker også å undersøke om denne behandlingen påvirker din inflammatoriske respons ved å måle uleike markører i blod og hvordan denne behandlingen indirekte påvirker blodkarenes evne til å trekke seg sammen da vi tidligere har sett at det kan være en link mellom det og insulinfølsomheten hos transplanterte pasienter. Studien er en nasjonal studie som leger ved Rikshospitalet har tatt initiativ til, i samarbeid med forskere ved Farmasøytisk institutt ved Universitetet i Oslo.

##### **Hva innebærer studien?**

Studien omfatter 2 perioder á 4 uker, hvor du vil få aktivt legemiddel (sitagliptin) i en periode og ingen behandling i en periode. Hvis du er kvinne og er i fertil alder må du bruke sikker prevensjon under, og inntil 90 dager etter, studien. Hvis du er gravid, eller ammer kan du ikke delta i studien. Hvis du bruker, eller under studien begynner å bruke helsekostpreparater, naturmidler eller legemidler som er forskrevet fra en lege som ikke er din faste nefrolog må du si fra til studielegen om dette. Du vil ikke bli tatt av noen behandling som du bruker nå.

Før du får noen behandling vil vi undersøke glukoseomsetningen i kroppen med en oral glukosebelastning. Du vil få 75g sukker oppløst i vann å drikke og det vil tas blodprøver ved start og i løpet av en 2 timers oppfølgingsperiode for analyse av blodsukker, insulin og inflammatoriske markører til denne undersøkelsen. Etter glukosebelastningen vil vi undersøke blodkarenes evne til å trekke seg sammen. Undersøkelsen gjøres ved hjelp av en svak laserstråle som gjennom huden måler de røde blodlegemenes hastighet. Laser-elektrodenes festes til huden med tape og blodårene stimuleres med et kroppsegent stoff (acetylkinolin) ved hjelp av elektriske strømmer med så lav styrke at det ikke føles. Dette gjør at blodårene utvider seg. Mot slutten av undersøkelsen vil vi klemme av blodtilførselen til underarmen i tre minutter med en vanlig blodtryksmansjett. Undersøkelsen er verken farlig eller spesielt ubehagelig (medfører ingen stikk), men du må ligge stille uten å prate under hele undersøkelsen, som til sammen tar ca 75 minutter. Disse to undersøkelsene vil repeteres etter hver av de to behandlingsperiodene.

Totalt vil det bli 7 ekstra besøk på Rikshospitalet, fire korte kontrollbesøk for å sikre at du ikke får noen farlige bivirkninger og tre lengre besøk der vi skal utføre de ulike undersøkelsene nevnt over (hvert av disse besøkene vil ta ca. fire timer).

##### **Mulige fordeler, ulemper og alvorlige bivirkninger**

Du vil sannsynligvis få bedre kontroll på blodsukret under denne aktive delen studien, noe som er positivt for din generelle helsetilstand. I tillegg vil du bidra til å øke kunnskapen om hvordan sitagliptin virker på nyretransplanterte pasienter, og denne kunnskapen kan på lengre sikt føre til en bedre og mer individualisert behandling av transplanterte pasienter. Ulempen ved å delta vil være at du i en periode ikke vil få optimal behandling for ditt høye blodsukker, men det er ikke skadelig i et lengre tidsperspektiv. Det vil også bli tatt noe ekstra blod og at du vil være nødt til å komme til

JANUVIA-08 – versjon nr. 3 – 30. mars 2011

Rikshospitalet noen ekstra undersøkelsesdager. Sitagliptin er generelt godt tolerert. Det er rapportert bivirkninger og de vanligste bivirkningene registrert så langt er; kvalme, gasser i magen, forstoppelse, hodepine, svimmelhet, hypoglykemi og ødemer. Nye bivirkninger som enda ikke er beskrevet kan forekomme da dette er et relativt nylig godkjent legemiddel. Hvis du føler noe ubehag ved behandlingen må du melde fra til din studielege så fort som mulig. Hvis vi oppdager noe ved din helse under denne studien som krever videre oppfølging vil vi sørge for at du får det.

### **Hva skjer med prøvene og informasjonen om deg?**

Prøvene tatt av deg og informasjonen som registreres om deg skal kun brukes slik som beskrevet i hensikten med studien. Alle opplysningene og prøvene vil bli behandlet uten navn og fødselsnummer eller andre direkte gjenkjennerende opplysninger. En kode knytter deg til dine opplysninger og prøver gjennom en navneliste. Listen som kan koble ditt navn til koden vil kun bli oppbevart på Rikshospitalet og bare personell med ansvar for studien har tilgang til denne.

Dataene og prøvene dine vil lagres i 15 år etter at sluttrapport for studien er skrevet. Etter det vil dataene bli anonymisert og prøvene destruert. Tidspunktet for dette vil være avhengig av hvor lang tid det tar før studien er ferdig.

Det vil ikke være mulig å identifisere deg i resultatene av studien når disse publiseres.

### **Frivillig deltakelse**

Det er frivillig å delta i studien. Du kan når som helst og uten å oppgi noen grunn trekke deg fra studien uten at det får konsekvenser for din videre behandling. Du undertegner samtykkeerklæringen dersom du ønsker å delta.

Har du spørsmål til studien, ta kontakt med Professor Trond Jenssen (23 07 19 07) eller Professor Anders Åsberg (22 85 65 59).

**Ytterligere informasjon om biobank, personvern, økonomi og forsikring finnes i kapittel A – Personvern, biobank, økonomi og forsikring.**

**Samtykkeerklæring følger etter kapittel A.** – *Signeres av både dem som samtykker til å delta i studien. Personen, som har informert om studien, kan bekrefte at informasjonen er gitt..*

JANUVIA-08 – versjon nr. 3 – 30. mars 2011

## Kapittel A - Personvern, biobank, økonomi og forsikring

### Personvern

Opplysninger som registreres om deg er generelle helseopplysninger og din sykehistorie i tillegg til data fra analysene og blodprøvene tatt av deg under studien.

Representanter fra sponsor, Statens legemiddelverk og kontrollmyndigheter i inn- og utland kan få utlevert studieopplysninger og gis innsyn i relevante deler av din journal. Formålet er å kontrollere at studieopplysningene stemmer overens med tilsvarende opplysninger i din journal. Alle som får innsyn i informasjon om deg har taushetsplikt.

### Forskningsbiobank

Blodprøvene som blir tatt og informasjonen utledet av dette materialet vil bli lagret i en forskningsbiobank. Prøver og resultater blir lagret i forskningsbiobanken som professor Anders Åsberg ved Farmasøytisk institutt er ansvarlig for. De oppbevares til 2025 før de blir destruert og slettet.

### Innsynsrett og oppbevaring av materiale

Hvis du sier ja til å delta i studien, har du rett til å få innsyn i hvilke opplysninger som er registrert om deg. Du har videre rett til å få korrigert eventuelle feil i de opplysningene vi har registrert. Dersom du trekker deg fra studien, vil det ikke samles inn flere opplysninger eller mer materiale. Opplysninger som allerede er innsamlet fra deg vil ikke bli slettet.

### Finansiering

Studien og biobanken er finansiert av forskerne bak studien som jobber ved Universitetet i Oslo og ved Rikshospitalet. Det blir ikke utbetalt noen kompensasjon utover dirkede utlegg i forbindelse med studien til deltakere eller forskere.

### Forsikring

Du er forsikret i henhold til Lov om produktansvar i Legemiddelforsikringen og i henhold til pasientskadeerstatningsordningen.

### Informasjon om utfallet av studien

Du vil etter hvert kunne få informasjon om studiens resultater ved henvendelse til hovedansvarlig lege for denne studien, professor Trond Jenssen ved Nyreseksjonen, Rikshospitalet.

## Samtykke for deltakelse i studien

Jeg er villig til å delta i studien

-----  
(Signert av prosjektdeltaker, dato)

## Bekreftelse på at informasjon er gitt deltakeren i studien

Jeg bekrefter å ha gitt informasjon om studien

-----  
(Signert, rolle i studien, dato)

## AV: Skjema for hjemmemåling av blodsukker

Pasientnr.	
Initialer	

Dato	Morgen, fastende	2 timer etter frokost	2 timer etter lunsj	2 timer etter middag	2 timer etter kveldsmat	Kommentarer/ev. tilleggsmåling

- Målingene skal foretas hver dag under studien.
- Ved mistanke om hypoglykemi; utfør nødvendige ekstramålinger og før resultatene opp i kolonnen til høyre.
- Ferdig utfylt skjema leveres siste undersøkelsesdag.



# Appendiks B: Individuelle data

**BI: Oversikt over dose immunsuppressiva hos pasientene i studien, oppgitt i mg/døgn.**

Pasientnr.	Ciklosporin	Tacrolimus	Everolimus	Mykofenolat- mofetil	Mykofenolat- natrium	Prednisolon
1	75			2000		5
2			4		1440	5
3	200			2000		5
4	200				720	7.5
6	200			2000		5
7	200			2000		5
8	300			2000		5
10		2				2.5
11	150			2000		5
12	200			2000		7.5
13	100		1.5			5
14		3			360	5
16	150			2000		5
17	200				1440	5
18		3		1000		5
19	150			2000		5
20		4			720	5
21	200			2000		5
22	175			1500		5
23		4		1500		5
24	200			2000		5
25	125			2000		5
26	200			2000		-
27	200			2000		5
28			2,5		1440	5/7.5

**BII: Konsentrasjon av immunsuppressive legemidler i blodet under studien, oppgitt i µg/L.**

Pasientnr.	Legemiddeltyper	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling
<b>1</b>	Ciklosporin	55	40	35
	Mykofenolat	4400	2700	5400
<b>2</b>	Everolimus	9.3	8.5	7.0
	Mykofenolat	12900	6700	7200
<b>3</b>	Ciklosporin	125	155	95
	Mykofenolat	4900	2900	900
<b>4</b>	Ciklosporin	60	100	135
	Mykofenolat	600	1100	6700
<b>6</b>	Ciklosporin	115	135	145
	Mykofenolat	3000	2000	2500
<b>7</b>	Ciklosporin	55	65	55
	Mykofenolat	1300	700	800
<b>8</b>	Ciklosporin	140	160	240
	Mykofenolat	800	700	500
<b>10</b>	Tacrolimus	6.7	6.6	6.8
<b>11</b>	Ciklosporin	120	150	150
	Mykofenolat	2100	2300	4700
<b>12</b>	Ciklosporin	100	80	65
	Mykofenolat	3000	3400	3200
<b>13</b>	Ciklosporin	60	< 25	30
	Everolimus	9.8	5.1	6.0
<b>14</b>	Tacrolimus	4.6	4.5	5.1
	Mykofenolat	2700	3000	3200
<b>16</b>	Ciklosporin	115	95	110
	Mykofenolat	700	900	900
<b>17</b>	Ciklosporin	105	55	85
	Mykofenolat	7200	2200	3400
<b>18</b>	Tacrolimus	4.6	4.2	6.7
	Mykofenolat	1100	2000	1000

<b>Pasientnr.</b>	<b>Legemiddeltper</b>	<b>Baseline</b>	<b>Kontrollperiode</b>	<b>Sitagliptinbehandling</b>
<b>19</b>	Ciklosporin	65	90	85
	Mykofenolat	3900	2700	2700
<b>20</b>	Tacrolimus	6.8	5.7	8.5
	Mykofenolat	6600	2000	2100
<b>21</b>	Ciklosporin	95	145	150
	Mykofenolat	1700	2500	1300
<b>22</b>	Ciklosporin	65	115	90
	Mykofenolat	1800	2600	2800
<b>23</b>	Tacrolimus	4.4	4.1	6.1
	Mykofenolat	1100	1500	5000
<b>24</b>	Ciklosporin	80	120	130
	Mykofenolat	1700	1200	2300
<b>25</b>	Ciklosporin	70	100	160
	Mykofenolat	2500	1800	4000
<b>26</b>	Ciklosporin	36	65	70
	Mykofenolat	2300	2700	2300
<b>27</b>	Ciklosporin	145	100	110
	Mykofenolat	3200	3800	1800
<b>28</b>	Everolimus	7.1	5.9	6.3
	Mykofenolat	2400	4000	2300

### BIII: Konsentrasjon av blodglukose under oral glukosetoleransetest (OGTT), oppgitt i mmol/L.

Pasient-nummer	B 0 min.	B 30 min.	B 120 min.	K 0 min.	K 30 min.	K 120 min.	S 0 min.	S 30 min.	S 120 min.
1	6.4	9.8	8.7	7.0	12.2	7.7	6.2	10.1	2.5
2	7.8	14.4	18.9	8.8	13.9	17.0	8.7	12.3	18.8
3	6.4	8.6	7.5	5.1	7.9	6.7	5.4	7.5	5.6
4	5.4	11.4	8.4	5.9	9.8	9.6	5.1	9.7	9.1
6	8.3	13.1	17.3	8.0	13.5	16.4	7.1	11.9	9.7
7	9.6	*	*	8.0	*	*	7.3	*	*
8	9.7	*	*	11.2	*	*	7.6	*	*
10	6.0	10.4	13.1	8	10.8	15.7	5.1	9.0	10.5
11	7.9	8.9	10.9	10.4	8.9	8.9	6.5	9.6	8.8
12	6.3	12.1	13.6	7.0	10.2	14.3	7.7	10.8	11.4
13	7.6	13.4	17.8	8.3	17.7	20.6	9.5	13.9	20.1
14	5.7	7.8	11.5	5.1	8.1	15.7	3.8	9.0	9.3
16	9,3	11,7	21,3	9,6	13	21,3	7,6	12,9	12,6
17	6,3	10,6	11	5,8	11,2	7,1	5,5	10,9	9,8
18	6,1	9,7	9,8	6,4	7,9	9	6,6	8,8	8,1
19	5,6	9,2	9,8	6,7	11,2	7,1	5,8	11,7	9,6
20	6,8	11,3	13,1	8,1	14,3	15,5	7	12,1	6,7
21	7,9	10,5	10,4	7,7	11,8	9,5	7,2	10,4	10,8
22	7,4	11,6	12,1	7,7	14,9	11,8	6,9	11,3	9,4
23	8,2	16,4	19,6	8,2	13,1	20,4	7,7	12,1	16,8
24	6,2	10,1	13,2	5,5	9,4	10,1	5,8	7,7	7,1
25	7,1	9,9	10,7	6,3	10,2	8,7	6,2	9,1	6,2
26	7	10,4	13,3	7,1	10,7	12,3	6,4	10,8	5,5
27	7,2	11,7	15,6	8,3	12,2	11,4	5,9	9	8,9
28	6,7	12	12,1	5,6	10,9	11,4	4,7	9,5	9,8

B: Baseline

K: Kontrollperiode

S: Sitagliptinbehandling

\*Ikke utført

**BIV: Konsentrasjon av C- peptid, oppgitt i nmol/L.**

Pasientnummer	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling
1	1.73	1.26	1.30
2	2.28	1.80	2.07
3	0.84	0.87	0.82
4	1.35	1.40	1.78
6	0.85	0.77	0.62
7	0.94	0.83	1.06
8	1.42	2.00	2.02
10	1.47	1.27	1.77
11	1.35	1.60	1.50
12	1.11	1.05	1.28
13	1.37	1.68	2.13
14	3.44	*	3.29
16	1,67	2,26	1,84
17	1,38	1,08	0,97
18	1,16	0,96	1,10
19	1,19	1,35	1,77
20	1,75	1,84	1,90
21	1,43	1,02	1,26
22	1,34	1,35	1,76
23	1,50	1,55	1,52
24	1,30	1,28	1,53
25	1,80	1,90	2,57
26	1,31	1,20	1,37
27	2,82	2,94	2,87
28	1,89	2,12	2,52

\*Mangler data

**BV: Konsentrasjon av insulin, oppgitt i pmol/L.**

Pasientnummer og undersøkelsesdag	0 minutter	30 minutter	120 minutter
1 Baseline	181.8	*	*
1 Kontrollperiode	68.8	628.8	1232.3
1 Sitagliptinbehandling	62.8	375.2	398.8
2 Baseline	153.8	315.8	869.1
2 Kontrollperiode	206.0	277.6	759.2
2 Sitagliptinbehandling	765.8	216.1	1258.4
3 Baseline	116.6	70.8	180.1
3 Kontrollperiode	43.1	177.8	208.4
3 Sitagliptinbehandling	62.5	154.6	130.3
4 Baseline	240.7	1697.1	837.8
4 Kontrollperiode	149.7	1549.4	490.1
4 Sitagliptinbehandling	221.2	1568.1	942.4
6 Baseline	**	255.0	533.1
6 Kontrollperiode	**	130.6	374.8
6 Sitagliptinbehandling	**	145.3	321.0
7 Baseline	120.3	*	*
7 Kontrollperiode	65.8	*	*
7 Sitagliptinbehandling	97.7	*	*
8 Baseline	144.7	*	*
8 Kontrollperiode	231.4	*	*
8 Sitagliptinbehandling	499.2	*	*
10 Baseline	82.2	223.7	272.3
10 Kontrollperiode	**	125.9	239.8
10 Sitagliptinbehandling	112.6	151.7	231.2
11 Baseline	20.9	195.5	454.1
11 Kontrollperiode	72.1	330.7	511.7
11 Sitagliptinbehandling	55.3	225.0	275.7
12 Baseline	84.0	280.0	386.3
12 Kontrollperiode	72.4	261.5	225.7
12 Sitagliptinbehandling	141.0	396.5	536.6
13 Baseline	194.7	334.6	609.5
13 Kontrollperiode	179.1	333.1	345.2
13 Sitagliptinbehandling	214.7	293.0	604.7
14 Baseline	442.7	407.3	449.5
14 Kontrollperiode	*	*	*
14 Sitagliptinbehandling	347.1	371.0	433.2
16 Baseline	377.7	398.6	629.7
16 Kontrollperiode	273.0	314.0	467.3
16 Sitagliptinbehandling	228.1	1089.2	592.9
17 Baseline	127.9	178.4	642.7
17 Kontrollperiode	92.8	234.9	534.2
17 Sitagliptinbehandling	113.9	334.7	694.4

<b>Pasientnummer og undersøkelsesdag</b>	<b>0 minutter</b>	<b>30 minutter</b>	<b>120 minutter</b>
18 Baseline	199.9	371.4	446.2
18 Kontrollperiode	169.4	236.6	443.5
18 Sitagliptinbehandling	240.2	270.7	418.3
19 Baseline	196.3	419.4	302.9
19 Kontrollperiode	195.6	630.6	522.6
19 Sitagliptinbehandling	230.2	998.0	360.2
20 Baseline	163.0	444.6	438.0
20 Kontrollperiode	128.8	379.6	433.5
20 Sitagliptinbehandling	86.3	454.6	191.5
21 Baseline	135.9	335.2	435.0
21 Kontrollperiode	110.6	344.8	259.5
21 Sitagliptinbehandling	115.7	399.7	531.8
22 Baseline	137.0	331.9	351.6
22 Kontrollperiode	133.5	417.3	321.6
22 Sitagliptinbehandling	199.5	553.2	443.3
23 Baseline	258.8	434.2	664.5
23 Kontrollperiode	318.5	308.0	1141.3
23 Sitagliptinbehandling	307.7	616.5	1596.5
24 Baseline	231.5	497.4	804.0
24 Kontrollperiode	227.8	507.2	587.0
24 Sitagliptinbehandling	164.9	427.5	533.2
25 Baseline	206.8	579.8	2531.2
25 Kontrollperiode	205.2	875.6	2034.2
25 Sitagliptinbehandling	289.6	824.9	825.7
26 Baseline	110.5	306.3	1319.8
26 Kontrollperiode	135.1	626.7	1215.7
26 Sitagliptinbehandling	150.1	470.1	631.5
27 Baseline	164.1	305.6	933.5
27 Kontrollperiode	167.9	392.8	629.0
27 Sitagliptinbehandling	172.5	394.5	772.0
28 Baseline	191.5	323.8	675.5
28 Kontrollperiode	178.3	126.4	815.3
28 Sitagliptinbehandling	148.0	455.8	913.0

\*Data mangler

\*\*Insulinkonsentrasjon lavere enn metodens deteksjonsgrense

**BVI a): Laser-Doppler, resultater fra undersøkelsen ved baseline.**

Pasientnummer	AUC <sub>ACh</sub> (AU x min)	AUC <sub>rh</sub> (AU x min)
1	297.4	*
2 **	501.3	2.5
3	46.5	1.5
4	107.2	0.3
6	60.4	5.9
7 **	520.6	17.5
8	270.7	-1.9
10	***	***
11	-0.8	35.1
12	258.2	0.8
13	145.6	*
14	756.8	29.3
16	167.2	7.7
17	628.3	-4.0
18	275.0	-5.0
19	254.4	-1.9
20 **	162.9	4.6
21 **	533.5	-11.4
22 **	691.0	6.8
23	39.1	15.7
24	102.5	-20.1
25	601.0	29.5
26	14.6	12.7
27	64.5	24.5
28	135.1	-2.2

\*Ikke målt

\*\*Pasient ekskludert før beregning av resultater på grunn av uspesifikk vasodilasjon

\*\*\*Pasient ekskludert fra Laser-Doppler undersøkelsen



**BVI b): Laser-Doppler, resultater fra undersøkelsen etter kontrollperioden.**

Pasientnummer	AUC <sub>ACh</sub> (AU x min)	AUC <sub>rh</sub> (AU x min)
1	495.2	-25.6
2 **	*	-2.0
3	489.4	-5.6
4	35.5	-0.9
6	110.3	7.3
7 **	610.2	42.8
8	511.8	82.9
10	***	***
11	201.1	28.5
12	28.6	1.5
13	309.4	20.7
14	481.7	-10.8
16	-16.5	30.9
17	246.1	6.4
18	712.9	6.6
19	413.0	44.7
20 **	529.9	48.1
21 **	473.2	-5.7
22 **	485.0	26.7
23	241.7	47.0
24	30.9	-30.4
25	207.8	41.8
26	339.1	7.5
27	126.6	15.4
28	74.5	10.9

\*Teknisk feil

\*\*Pasient ekskludert før beregning av resultater på grunn av uspesifikk vasodilatasjon

\*\*Pasient ekskludert fra Laser-Doppler undersøkelsen

**BVI c): Laser-Doppler, resultater fra undersøkelsen etter sitagliptinbehandling.**

Pasientnummer	AUC <sub>ACh</sub> (AU x min)	AUC <sub>rh</sub> (AU x min)
1	748.2	97.7
2 **	521.6	-27.3
3	132.7	12.9
4	62.0	24.6
6	378.4	0.0
7 **	254.2	52.5
8	374.5	75.9
10	***	***
11	510.4	31.7
12	384.8	-5.0
13	32.6	-34.4
14	141.1	-5.8
16	141.6	29.2
17	258.6	9.7
18	*	21.9
19	341.6	13.8
20 **	355.0	221.6
21 **	523.7	11.3
22 **	488.8	12.1
23	191.2	20.4
24	332.4	-47.8
25	277.4	52.0
26	285.3	-0.4
27	-21.3	19.3
28	19.3	6.8

\*Ikke målt

\*\*Pasient ekskludert før beregning av resultater på grunn av uspesifikk vasodilasjon

\*\*\*Pasient ekskludert fra Laser-Doppler undersøkelsen

**BVII: Konsentrasjon av mikro-CRP, oppgitt i ng/mL.**

Pasientnummer	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling
1	11803	12097	9789
2	1594	1214	1279
3	12500	13012	11413
4	1702	2482	7055
6	6837	6901	2803
7	1545	5014	7268
8	6018	3496	1786
10	1865	1042	1697
11	4248	9604	5383
12	3416	3091	3929
13	7582	2240	1137
17	12471	4863	2691
18	1135	12847	1366
19	7757	2450	948
20	1231	1057	1952
21	1137	4935	713
22	2672	2283	3156
23	7682	5858	7441
24	942	1519	1151
25	638	1025	1585
26	7236	4638	2954
27	1700	2948	1004
28	8630	3752	5065

**BVIII: Konsentrasjon av sTNFR-1, oppgitt i pg/mL.**

<b>Pasientnummer</b>	<b>Baseline</b>	<b>Kontrollperiode</b>	<b>Sitagliptinbehandling</b>
1	488,202	462,691	440,79
2	441,658	435,431	399,779
3	387,466	345,971	372,264
4	509,63	510,844	461,078
6	317,077	414,831	366,089
7	271,764	291,677	293,571
8	470,931	457,978	489,312
10	417,652	370,647	344,869
11	494,392	456,229	440,077
12	444,017	428,163	429,173
13	253,191	262,448	267,752
16	492,395	492,025	435,304
17	386,527	368,987	311,244
18	322,639	325,378	241,955
19	468,977	375,599	325,453
20	452,865	405,452	471,369
21	248,838	267,267	246,396
22	393,961	401,104	368,318
23	342,501	316,194	325,668
24	290,614	270,851	261,961
25	425,111	417,002	384,122
26	396,82	284,21	235,484
27	406,36	445,456	437,814
28	317,334	216,942	268,315

**BIX: Konsentrasjon av VCAM-1, oppgitt i ng/mL.**

Pasientnummer	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling
1	967,7	933,9	840,5
2	563,1	522,3	562,7
3	512,0	635,6	535,1
4	983,9	935,3	954,3
6	452,5	543,7	572,6
7	654,1	964,6	773,7
8	878,8	774,7	749,2
10	839,5	768,0	878,2
11	819,7	861,5	638,2
12	659,3	599,5	603,3
13	562,0	676,7	851,4
16	1927,0	2004,6	1552,1
17	810,5	695,9	648,2
18	1124,7	1256,4	733,3
19	1539,2	737,8	676,4
20	718,3	695,9	632,9
21	1207,5	1004,9	1003,5
22	2641,7	1409,5	1702,0
23	562,9	444,4	522,1
24	1270,2	1188,6	1022,3
25	728,6	515,9	618,3
26	677,6	624,7	1005,7
27	1074,0	1064,4	993,4
28	497,8	546,7	609,3

**BX: Konsentrasjon av adiponectin, oppgitt i ng/mL.**

Pasientnummer	Baseline	Kontrollperiode	Sitagliptinbehandling
1	85096,1	188196,4	85392,3
2	75100,0	42582,2	115626,5
3	38320,5	148541,9	137271,2
4	98456,7	222836,7	51734,2
6	43511,0	38919,2	44850,7
7	29200,4	27341,2	30351,4
8	33539,3	39563,0	37140,4
10	72834,9	49256,5	37479,8
11	90363,9	101796,7	78703,1
12	48420,2	51958,5	39653,8
13	27175,1	62864,5	255343,4
16	32071,0	49146,7	24927,4
17	29937,7	30833,3	41200,5
18	44176,7	36661,5	58587,6
19	84961,4	68786,4	112471,7
20	32751,3	52693,9	30206,4
21	56914,8	62659,1	66491,5
22	83463,8	67142,0	83903,0
23	32478,1	25262,2	24504,4
24	25198,8	31914,3	35864,1
25	20997,3	28137,7	28163,1
26	200609,0	21742,9	21753,9
27	21444,4	23532,0	56884,7
28	96870,8	38332,6	91936,1

# Appendiks C: Poster Vintermøtet 2012

Norsk Selskap for Farmakologi og Toksikologi (NSFT), Beitostølen 26.-29. januar 2012.

## The effect of sitagliptin treatment on glucose metabolism and endothelial function in renal transplant recipients.



HALDEN T<sup>1</sup>, VIK K<sup>1</sup>, ÅSBERG A<sup>1</sup>, HARTMANN A<sup>2</sup>, JENSSEN T<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Biosciences, School of Pharmacy, University of Oslo.

<sup>2</sup>Laboratory for Renal Physiology, Medical Department, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Center.

<sup>3</sup>Medical Department, Rikshospitalet Medical Center.

### Introduction

Renal transplant recipients suffer to a high degree of cardiovascular disease such as; hypertension, impaired glucose tolerance (IGT)/new-onset diabetes after transplantation (NODAT), dyslipidemia and endothelial dysfunction. They have a higher incidence of mortality than the general population, mainly due to cardiovascular disease. Sitagliptin (Januvia<sup>®</sup>, Merck Sharp & Dohme Ltd), a dipeptidylpeptidase-4 inhibitor (DPP-4 inhibitor), increases systemic levels of the incretin hormones glucagon like peptide-1 (GLP-1) and glucose dependent insulinotropic peptide (GIP) since these hormones are hydrolyzed by DPP-4. Indirectly sitagliptin hence stimulates insulin secretion and inhibits glucagon release, two central mechanisms in IGT/NODAT. Recent research indicates that sitagliptin also reduce inflammatory responses *in vitro*<sup>1</sup>. Arora *et al* has in addition shown that systemic markers of inflammation are associated with negative cardiovascular effects in transplanted patients<sup>2</sup>.

### Methods

In a prospective, open, randomized, controlled, cross-over study we have included 25 patients to receive sitagliptin (dose adjusted to renal function) or no treatment for 4 weeks each (figure 1). Main inclusion criteria were adult renal transplant recipients more than 1 year post transplant with stable renal function and stable prednisolone dose that were in need of (additional) oral anti-diabetic treatment. Patients with severe liver disease, estimated GFR < 25 ml/min/1.73 m<sup>2</sup>, pregnant/nursing mothers and patients on insulin treatment were excluded.

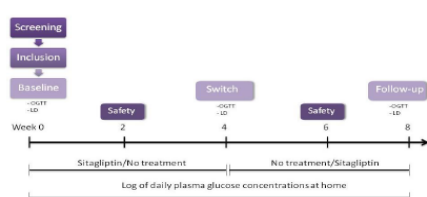


Table 1: The current WHO criteria were used to classify patients into glucose categories.  
\*Venous plasma glucose 2-h after ingestion of 75g oral glucose load.

<b>Diabetes</b>	
Fasting plasma glucose	≥7.0mmol/l
or	
2-h plasma glucose*	≥11.1mmol/l
or	
HbA1c	≥6.5%
<b>Impaired Glucose Tolerance (IGT)</b>	
Fasting plasma glucose	<7.0mmol/l
2-h plasma glucose*	≥7.8 and <11.1 mmol/l

#### Statistics:

- Paired t-test was used for paired statistical analysis.
- GraphPad Prism 5 software was used for all statistical analysis.
- P-values < 0.05 were considered statistical significant.

Figure 1: Study design.

Oral glucose tolerance test (OGTT) for the estimation of insulin secretion and sensitivity, C-peptide to glucose, creatinine ratio (CPGCR) for renal function adjusted insulin secretion and Laser-Doppler flowmetry (LD) for determination of endothelial function were performed before and after each treatment phase. In addition to the plasma glucose concentrations measured at the OGTT investigations, each patient performed and logged daily plasma glucose concentrations at home. Inflammatory markers will be analyzed with commercially available ELISA-kits.

### Results

Results from 20 patients are available so far. The average age of these patients were 62.7±11.2 (11 male and 9 female) and they were included in the study 2.4±2.1 years after transplantation. They were treated with cyclosporine or tacrolimus together with prednisolone and/or mycophenolate mofetil as immunosuppressive therapy. Four patients received glipizide and two glimepiride for treatment of diabetes prior to inclusion. 12 patients were classified with NODAT and 8 were classified with IGT following OGTT at baseline. Preliminary results show a statistical significant and clinical relevant reduction in plasma glucose levels 120 minutes following OGTT (table 2, figure 2a) and in the levels logged four times a day at home (figure 2b) with sitagliptin treatment. Sitagliptin treatment gave in addition a statistical significant increase in CPGCR (p = 0.043, n=12). Endothelial function (table 3, figure 3), show great interindividual differences but no relevant effect with sitagliptin treatment. Further analyses are under way.

Table 2: Changes in plasma glucose levels (mmol/L) in mean (±SD) following OGTT.

	0 min	30 min	120 min
Baseline	7.2±1.3	11.2±2.2	13.0±4.2
No treatment	7.7±1.6	11.7±2.7	13.0±5.0
Sitagliptin	6.7±1.3	10.8±1.7	10.5±4.4
Δ sitagliptin versus no treatment			
mmol/L	-0.5	-0.4	-2.5
%	-7.2	-3.4	-19.3
P-value	0.054	0.310	0.002

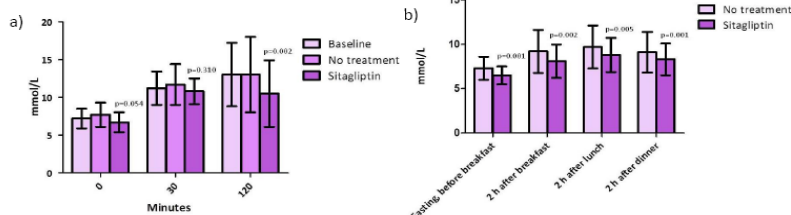


Figure 2: Plasma glucose levels (mmol/L) in mean and standard deviation following OGTT (a) and logged at home (b).

Table 3: Changes in endothelial function in mean (±SD) after sitagliptin treatment and no treatment.

	Δ Sitagliptin versus baseline	Δ No treatment versus baseline	P-value
AUC <sub>ACH</sub> (AU min)	16.0±238.2	29.4±199.0	0.743
AUC <sub>Rh</sub> (AU min)	16.5±48.0	10.2±24.1	0.430

Note. Abbreviations used: AUC; area under the flux versus time curve; ACh, acetylcholine chloride; AU min, arbitrary units x minutes (skin blood perfusion was measured as flux [velocity x concentration obtained from the Laser-Doppler signal] in AU); Rh, reactive hyperemia;.

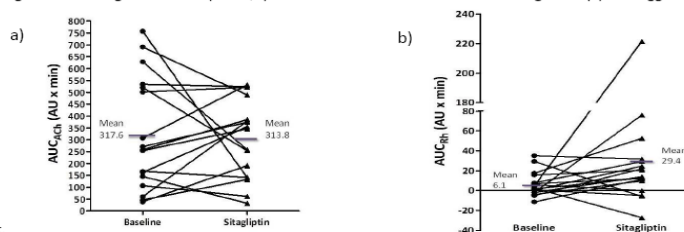


Figure 3: Changes in endothelial function from baseline to sitagliptin treatment measured in AU x minutes for AUC<sub>ach</sub> (a) and AUC<sub>Rh</sub> (b), (n=17).

### Conclusion

This is the first study where sitagliptin is tested in renal transplant recipients and preliminary results indicate that sitagliptin effectively regulate glucose metabolism and is safe in diabetic renal transplant recipients not in need of insulin treatment. Plasma glucose concentrations after an overnight fast and 120 minutes following OGTT are both improved with sitagliptin treatment. Further analyses will be performed when all patients have completed the study. Inflammatory markers will be analyzed to elucidate more on effects of sitagliptin on cardiovascular risk factors.

---